

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE MINAS GERAIS
Programa de Pós-graduação em Odontologia

Hércules Henrique Onibene Castro

**EFEITO DO ALENDRONATO DE SÓDIO NA ATIVIDADE DE FAGÓCITOS
HUMANOS ESTIMULADOS *IN VITRO* COM *Porphyromonas gingivalis***

Belo Horizonte

2022

Hércules Henrique Onibene Castro

**EFEITO DO ALENDRONATO DE SÓDIO NA ATIVIDADE DE FAGÓCITOS
HUMANOS ESTIMULADOS *IN VITRO* COM *Porphyromonas gingivalis***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Odontologia, Área de Concentração: Clínicas Odontológicas.

Linha de Pesquisa: Biologia Oral

Orientador: Prof. Dr. Paulo Eduardo Alencar de Souza

Belo Horizonte

2022

FICHA CATALOGRÁFICA

Elaborada pela Biblioteca da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais

C355e	Castro, Hércules Henrique Onibene Efeito do alendronato de sódio na atividade de fagócitos humanos estimulados <i>in vitro</i> com <i>Porphyromonas gingivalis</i> / Hércules Henrique Onibene Castro. Belo Horizonte, 2022. 116 f. : il. Orientador: Paulo Eduardo Alencar de Souza Tese (Doutorado) - Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais. Programa de Pós-Graduação em Odontologia 1. Doença periodontal - Tratamento. 2. Alendronato. 3. Difosfonatos. 4. Monócitos. 5. Granulócitos. 6. Citocinas. 7. Porphyromonas gingivalis. 8. Sistema imunológico. I. Souza, Paulo Eduardo Alencar de. II. Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. III. Título. CDU: 616.311.2
-------	--

Hércules Henrique Onibene Castro

**EFEITO DO ALENDRONATO DE SÓDIO NA ATIVIDADE DE FAGÓCITOS
HUMANOS ESTIMULADOS *IN VITRO* COM *Porphyromonas gingivalis***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Odontologia, Área de Concentração: Clínicas Odontológicas.

COMPOSIÇÃO DA BANCA EXAMINADORA:

- 1- Profa. Dra. Paula Rocha Moreira – UFMG
- 2- Profa. Dra. Mila Fernandes Moreira Madeira – UFMG
- 3- Prof. Dr. Vinícius de Paiva Gonçalves – PUC Minas
- 4- Profa. Dra. Joice Dias Corrêa – PUC Minas
- 5- Prof. Dr. Paulo Eduardo Alencar de Souza – PUC Minas

DATA DA APRESENTAÇÃO E DEFESA: 18 de abril de 2022

A tese, nesta identificada, foi aprovada pela Banca Examinadora

Prof. Dr. Paulo Eduardo Alencar de Souza
Orientador

Prof. Dr. Rodrigo Villamarim Soares
**Coordenador do Programa de Pós-graduação
em Odontologia**

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me dar força, sabedoria e saúde e proporcionar esta experiência em minha vida.

Agradeço aos meus pais Luís Fernando e Ercília Onibene, por não me abandonarem em nenhum momento e me possibilitaram chegar até aqui.

À minha noiva Júlia Saldanha por me acompanhar durante todo este processo sempre me apoiando e não me deixando desistir dos meus objetivos.

Ao meu filho Henrique Onibene que nasceu durante a pandemia e foi a maior alegria em minha vida.

Agradeço ao Professor Paulo Eduardo pela amizade, incentivo, confiança, por me acompanhar desde o 2º período da graduação, por aceitar ser meu orientador e continuar com o projeto que iniciamos há alguns anos. Mesmo mudando os planos devido às adversidades vividas durante a pandemia conseguimos terminar este projeto.

Agradeço a professora Walderez Ornelas Dutra e a pós-doutoranda Carolina Cattoni Koh, por abrirem as portas mais uma vez do Laboratório de Biologia das Interações Celulares do ICB/UFMG, para a realização dos experimentos.

A todos os meus colegas e alunos da Faculdade PROMOVE que me apoiaram e escutaram por muito tempo falando sobre meu doutorado.

Agradeço aos meus familiares e amigos que estiveram presentes nesta longa jornada, me apoiando e incentivando a não desistir dos meus objetivos.

Aos colegas de doutorado durante estes 4 anos de muito trabalho.

Aos funcionários da PUC Minas que sempre me receberam com muito carinho e fizeram este caminho parecer mais tranquilo.

À CAPES pela concessão da bolsa, possibilitando a realização do doutorado.

E a todos que de alguma forma estiveram presentes e me incentivaram durante este processo.

RESUMO

O alendronato de sódio (Ale) é um bisfosfonato amplamente utilizado de forma sistêmica no tratamento da osteoporose. Devido à propriedade de inibição da reabsorção óssea, estudos clínicos recentes têm mostrado resultados satisfatórios do uso tópico de Ale a 1% na forma de gel, como coadjuvante no tratamento da doença periodontal. Embora os principais alvos farmacológicos dos bisfosfonatos sejam os osteoclastos, essas drogas podem ser endocitadas por células fagocíticas e causar alterações na diferenciação celular e na produção de citocinas. Macrófagos e neutrófilos desempenham papel importante tanto no combate direto aos periodontopatógenos, quanto no controle das respostas imunoinflamatórias, por meio da liberação de citocinas e produção de moléculas com atividade microbicida. Nesse contexto, a utilização tópica de Ale pode afetar as respostas biológicas nos tecidos periodontais em sítios com periodontite. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de dose de uso tópico periodontal de Ale a 1% na viabilidade celular e expressão de moléculas envolvidas nas respostas imunoinflamatórias por monócitos e granulócitos humanos, estimulados *in vitro* com *Porphyromonas gingivalis* (Pg). Para isso, sangue periférico de 10 doadores saudáveis foi incubado com Ale a 1% (0,03M) por 2 horas. Em seguida, foi adicionada Pg e as amostras incubadas por mais 6 horas. Após lise das hemácias, foram realizadas reações de imunofluorescência para análise por citometria de fluxo. Foram analisadas as expressões de TLR2, TLR4, DHR123, IL-1 β , IL-8, IL-10 e TNF nas populações de granulócitos e monócitos, identificadas pelos marcadores de superfície CD66b e CD14, respectivamente, além da expressão de TGF- β 1 em monócitos. Adicionalmente, foi avaliada a expressão das citocinas por subpopulações de monócitos fenotipicamente identificadas pelos marcadores CD14 e CD16. Análises por citometria de fluxo mostraram que Ale reduziu a expressão de CD66b, DHR123, TLR4, IL-8 e TNF nos granulócitos não estimulados com bactéria. Considerando células estimuladas com Pg, Ale reduziu a mediana de intensidade de fluorescência (MIF) de CD66b, TLR2, TLR4, IL-1 β e IL-8, embora tenha aumentado a MIF de DHR123 e as frequências de células positivas para TLR2, TNF e IL-10 nos granulócitos. Análise da população de monócitos não estimulada com bactéria mostrou que Ale reduziu a expressão de TLR2, TLR4 e de todas as citocinas avaliadas. Considerando monócitos estimulados com Pg, Ale reduziu a expressão de TLR4, IL-1 β , IL-8, TNF e IL-10 e aumentou a frequência de células TLR2⁺. As análises mostraram ainda que Ale afeta de modo distinto a produção de citocinas pelas subpopulações de monócitos clássicos, intermediários e não-clássicos. Os dados sugerem que concentrações de uso tópico de Ale são capazes de afetar a expressão de moléculas envolvidas nas respostas imunoinflamatórias por leucócitos ativados por periodontopatógeno. Embora a inibição da expressão de moléculas relacionadas aos processos de inflamação e destruição tecidual possa contribuir para a melhoria nos parâmetros clínicos periodontais, essa modulação pode afetar os mecanismos envolvidos no combate às bactérias nos tecidos periodontais.

Palavras-chave: Alendronato de sódio. Monócitos. Granulócitos. Citocinas. *Porphyromonas gingivalis*.

ABSTRACT

Sodium alendronate (Ale) is a bisphosphonate widely used systemically in the treatment of osteoporosis. Due to its bone resorption inhibition property, recent clinical studies have shown satisfactory results from the topical use of 1% Ale in the form of gel, as an adjunct in the treatment of periodontal disease. Although the main pharmacological targets of bisphosphonates are osteoclasts, these drugs can be endocytosed by phagocytic cells and cause changes in cell differentiation and cytokine production. Macrophages and neutrophils play an important role both in the direct fight against periodontopathogens and in the control of immunoinflammatory responses, through the release of cytokines and production of molecules with microbicidal activity. In this context, the topical use of Ale may affect biological responses in periodontal tissues at sites with periodontitis. The objective of this work was to evaluate the effect of a topical periodontal dose of Ale (1%) on cell viability and expression of molecules involved in immunoinflammatory responses by human monocytes and granulocytes, stimulated in vitro with *Porphyromonas gingivalis* (Pg). For this, peripheral blood from 10 healthy donors was incubated with 1% Ale (0,03M) for 2 hours. Then, Pg was added and the samples incubated for another 6 hours. After lysis of the red blood cells, immunofluorescence reactions were performed for analysis by flow cytometry. Expressions of TLR2, TLR4, DHR123, IL-1 β , IL-8, IL-10, TNF in the granulocyte and monocyte populations, identified by the surface markers CD66b and CD14, respectively, in addition to the expression of TGF- β 1 in monocytes. Additionally, the expression of cytokines by subpopulations of monocytes phenotypically identified by markers CD14 and CD16 was evaluated. Flow cytometric analysis showed that Ale reduced the expression of CD66b, DHR123, TLR4, IL-8 and TNF in granulocytes not stimulated with bacteria. Considering cells stimulated with Pg, Ale reduced the median fluorescence intensity (MFI) of CD66b, TLR2, TLR4, IL-1 β and IL-8, although it increased the MFI of DHR123 and the frequencies of positive cells for TLR2, TNF and IL-10 on granulocytes. Analysis of the monocyte population not stimulated with bacteria showed that Ale reduced the expression of TLR2, TLR4 and of all evaluated cytokines. Considering monocytes stimulated with Pg, Ale reduced the expression of TLR4, IL-1 β , IL-8, TNF and IL-10 and increased the frequency of TLR2⁺ cells. The analysis also showed that Ale differently affects the production of cytokines by subpopulations of classical, intermediate and non-classical monocytes. The data suggest that topical Ale concentrations are able to affect the expression of molecules involved in immunoinflammatory responses by periodontopathogen activated leukocytes. Although the inhibition of the expression of molecules related to the processes of inflammation and tissue destruction can contribute to the improvement of periodontal clinical parameters, this modulation can affect the mechanisms involved in the fight against bacteria in periodontal tissues.

Keywords: Sodium alendronate. Monocytes. Granulocytes. Cytokines. *Porphyromonas gingivalis*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Gráficos de plotagem de pontos representativos mostrando a estratégia de análise e a seleção da população de granulócitos (CD66b ⁺), de monócitos totais (CD14 ⁺), e das subpopulações de monócitos, fenotipicamente identificadas	45
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Efeito do alendronato de sódio na expressão dos marcadores por granulócitos humanos (CD66b ⁺) estimulados ou não com Pg	93
Tabela 2: Efeito do alendronato de sódio na expressão dos marcadores por monócitos humanos (CD14 ⁺) estimulados ou não com Pg	94

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ale	Alendronato de sódio
BF	Bisfosfonatos
DHR123	Diidrorodamina123
EGF	Fator de crescimento epidérmico
IFN- γ	Interferon-gama
IL-1	Interleucina- 1
IL-8	Interleucina- 8
LPS	Lipopolissacarídeos
LTh1	Linfócito T auxiliar do tipo 1
LTh2	Linfócito T auxiliar do tipo 2
M1	Macrófagos pró- inflamatórios
M2	Macrófagos anti-inflamatórios
MCP-1	Proteína quimioatratante de monócitos-1
MMP	Metaloproteinase de matriz
NK	Natural Killer
NETs-	Armadilhas extracelulares de neutrófilos
NIC	Nível de inserção clínica
PAMPS	Padrões moleculares associados a patógenos
Pg	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
PGE ₂	Prostaglandina 2
PRRs	Receptores de reconhecimento de padrões
PS	Profundidade de sondagem
ROS	Espécies reativas do oxigênio
SS	Sangramento a sondagem
TGF- β 1	Fator de transformação de crescimento beta 1
TLR	<i>Toll like receptor</i>
TNF	Fator de necrose tumoral
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REFERENCIAL TEÓRICO	21
2.1	Bisfosfonatos	21
2.2	Doença periodontal.....	23
2.2.1	<i>Características clínicas.....</i>	23
2.2.2	<i>Periodontopatógenos e resposta imunoinflamatória periodontal</i>	25
2.2.3	<i>Fagócitos na doença periodontal.....</i>	30
2.3	Efeitos dos bisfosfonatos em células imunocompetentes	33
2.4	Utilização tópica dos bisfosfonatos no tratamento periodontal	35
3	HIPÓTESES	37
4	OBJETIVOS	39
4.1	Objetivo geral	39
4.2	Objetivos específicos.....	39
5	MATERIAL E MÉTODOS	41
5.1	Alendronato de Sódio.....	41
5.2	Preparo das bactérias.....	41
5.3	Amostras de sangue.....	41
5.4	Tratamento com alendronato de sódio e estimulação com <i>P. gingivalis</i>	42
5.5	Análise da viabilidade celular	43
5.6	Avaliação da produção de espécies reativas do oxigênio	43
5.7	Reações de imunofluorescência para marcação de TLR e citocinas	43
5.8	Citometria de fluxo.....	44
5.9	Análises estatísticas	44
6	ARTIGOS.....	47
6.1	Artigo Científico 1	47
6.2	Artigo Científico 2	68
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	93
	REFERÊNCIAS	95
	ANEXO A - Parecer Consubstanciado do CEP PUC Minas.....	111
	ANEXO B - Produção intelectual do aluno durante o Curso de Doutorado	113

1 INTRODUÇÃO

Os bisfosfonatos (BF) são utilizados como principais medicamentos nas terapias para doenças que afetam o metabolismo ósseo, como a osteoporose e doença de Paget, assim como em tumores malignos e metástases intraósseas (BURR; RUSSELL, 2011; CORRAL-GUDINO *et al.*, 2017; MADRID; SANZ, 2009). Os BF também podem ser utilizados como carreadores de outros medicamentos como antibióticos, hormônios e anticancerígenos (FARRELL *et al.*, 2018; SEDGHIZADEH *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2018).

Ao serem administrados, por via oral ou por via intravenosa, os BF se depositam na matriz óssea por meio de interação com os cristais de hidroxiapatita. Depois desta interação, quantidades pequenas das drogas são liberadas durante a remodelação óssea, resultando em uma meia-vida estimada em anos (LIN, 1996; PAPAPOULOS; CREMERS, 2007).

A principal atividade farmacológica dos BF consiste na inibição da reabsorção óssea pelos osteoclastos, na medida em que eles iniciam a reabsorção da matriz óssea, liberando as drogas depositadas na mesma (MADRID; SANZ, 2009).

A doença periodontal é um processo inflamatório que pode afetar gengiva, ligamento periodontal e osso alveolar. É causada principalmente pelo acúmulo de biofilme dental disbiótico, que induz uma resposta imunoinflamatória com liberação de diversos mediadores químicos envolvidos nos processos de reabsorção óssea e degradação da matriz extracelular, causando danos muitas vezes irreversíveis, como a perda de inserção (ATA-ALI *et al.*, 2015). Dentre as espécies bacterianas na doença periodontal estão *Porphyromonas gingivalis* (Pg) e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, importantes para o aparecimento e progressão da periodontite (ATA-ALI *et al.*, 2015).

O controle das respostas imunoinflamatórias nos tecidos periodontais envolve a secreção de citocinas, a expressão de moléculas co-estimulatórias de superfície celular e a produção de enzimas relacionadas à atividade microbicida pelas células imunocompetentes. A expressão diferencial dessas moléculas determina o curso do processo inflamatório, estimulando o combate aos microrganismos e induzindo ativação de mecanismos de destruição tecidual (TAMAI; SUGIYAMA; KIYOURA, 2011).

Devido à propriedade de inibição da reabsorção óssea, estudos recentes têm investigado o potencial dos BF no tratamento da doença periodontal. Em estudos clínicos, a utilização tópica do alendronato de sódio (Ale) na forma de gel a 1%, como adjuvante no tratamento periodontal não cirúrgico, tem mostrado redução no sangramento à sondagem, nível de inserção clínica e profundidade de sondagem (DUTRA *et al.*, 2017; PRADEEP *et al.*, 2012; PRADEEP

et al., 2013; SHARMA; PRADEEP, 2012a; SHARMA; PRADEEP, 2012b; PRADEEP *et al.*, 2017).

O uso tópico dos BF como terapia complementar no tratamento de doenças periodontais e periimplantares, embora em concentrações bem maiores que as encontradas no plasma sanguíneo quando administrados sistemicamente, parece promissor e com menos efeitos indesejáveis. Isto porque, não são biodisponibilizados sistemicamente, evita-se o surgimento de osteonecrose dos maxilares (PRADEEP *et al.*, 2012; SOILEAU, 2006; WANG; WEBER; MCCAULEY, 2007).

Embora os efeitos dos BF na atividade de osteoclastos tenham sido muito estudados, pouco se conhece sobre seus efeitos em células imunocompetentes, principalmente quando estimuladas por produtos da microbiota periodontal. Considerando o papel dessas células no combate aos microrganismos periodontais e seus produtos, torna-se relevante avaliar os efeitos dos BF tópicos, utilizados em doses elevadas, na atividade de leucócitos humanos estimulados com periodontopatógenos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Bisfosfonatos

Os bisfosfonatos foram descobertos em meados de 1800, mas foi na década de 1960 que começaram a ser utilizados para o tratamento de doenças ósseas metabólicas, incluindo a ossificação heterotópica, displasia fibrosa, osteogênese imperfeita, doença de Paget, hipercalcemia, câncer metastático e mieloma múltiplo (WATTS, 2014). Posteriormente, passaram a ser utilizados também no tratamento da osteoporose (DANNEMANN *et al.*, 2007; NAYAK; GREENSPAN, 2017).

Os BF são medicamentos utilizados para diminuir a reabsorção óssea e são análogos químicos da substância endógena, ácido pirofosfórico, encontrada no organismo humano como pirofosfato, um inibidor natural da reabsorção óssea. No entanto, esta substância não pode ser utilizada como meio terapêutico, pois sofre rápida hidrólise enzimática. A diferença dos BF para o ácido pirofosfórico é que o átomo central de oxigênio é substituído por um de carbono e os grupos radicais ligados a este carbono aumentam a resistência à degradação enzimática, possibilitando maior meia-vida, suficiente para influenciar o metabolismo ósseo (FERNANDES; LEITE; LANÇAS, 2005).

Devido à sua grande afinidade por cálcio, os BF se aderem fortemente ao tecido ósseo e, ao serem liberados da matriz durante a remodelação óssea e absorvidos pelos osteoclastos, atuam nessas células inibindo a reabsorção óssea (RODAN; FLEISCH, 1996; RUSSELL 2011). Depois desta interação com o tecido ósseo, quantidades pequenas das drogas são liberadas durante a remodelação óssea, resultando em uma meia-vida estimada em anos (LIN, 1996; PAPAPOULOS; CREMERS, 2007).

O principal mecanismo de ação difere entre as duas classes de BF. Os BF não nitrogenados (etidronato, clodronato e tiludronato), também denominados de primeira geração, possuem estrutura química mais semelhante ao ácido pirofosfórico e, ao serem metabolizados pelos osteoclastos, geram adenosina trifosfato tóxica e, conseqüentemente, morte destas células por apoptose (RODAN; FLEISCH, 1996). Já os BF nitrogenados (alendronato, rizendronato, ibandronato, pamidronato e zoledronato) reduzem a atividade dos osteoclastos e induzem a apoptose através da inibição da síntese da enzima difosfato de farnesil, que inibe a prenilação de proteínas e interfere na organização do citoesqueleto (formação da borda em escova),

afetando os osteoclastos e o padrão normal de reabsorção óssea (KIMMEL, 2007). Os BF nitrogenados possuem maior atividade em menores doses (SILVERMAN *et al.*, 2007).

Com a administração de BF por via oral, os níveis adequados de inibição da reabsorção óssea são observados somente após algumas semanas (BRUNSVOLD *et al.*, 1992; ROGERS *et al.*, 2000).

A utilização dos BF causa uma diminuição rápida e substancial dos marcadores de remodelação óssea com um efeito máximo em 3 a 6 meses e aumento na densidade óssea (3 a 5%) nos primeiros anos de tratamento da osteoporose, seguido por período de estabilização. Com a continuação do tratamento, o novo estado de equilíbrio é mantido por 10 anos ou até mais (WATTS, 2014).

Um dos principais problemas dos BF é que eles diminuem a angiogênese, reduzindo a vascularização e comprometendo a chegada e a migração de células precursoras do reparo ósseo, como os osteoclastos e osteoblastos. Isto aumenta a chance de necrose óssea. Outra consequência associada ao uso dos BF é que estes fármacos induzem apoptose dos queratinócitos, o que causa alterações na mucosa do trato digestivo, inclusive na cavidade oral (WALTER *et al.*, 2010).

Os BF são muito utilizados para o tratamento de pacientes com osteoporose, embora os benefícios e malefícios de sua utilização ainda não sejam completamente conhecidos (BLACK; BAUER, 2012; WHITAKER *et al.*, 2012). Os BF também são utilizados para o controle de metástases ósseas, pois eles não somente inibem a proliferação e induzem apoptose de células neoplásicas malignas em cultura, como também interferem na adesão das células neoplásicas e osteoblastos à matriz óssea, reduzindo a migração e invasão celular (CARAGLIA *et al.*, 2006; KUBISTA *et al.*, 2006; LOPES-OLIVO *et al.*, 2012; O'CARRIGAN *et al.*, 2017).

Pesquisas demonstram que doses elevadas sistêmicas de BF afetam a remodelação óssea por inibição da atividade osteoclástica e, portanto, seu uso pode prejudicar o processo de reparo ósseo, comprometendo a osseointegração dos implantes em alguns pacientes (GANGULI *et al.*, 2002; GOZIOTIS *et al.*, 1995). Para evitar a administração sistêmica e de doses elevadas, pesquisas têm sido realizadas com a utilização tópica destes medicamentos (MADRID; SANZ, 2009).

Um dos principais efeitos indesejáveis dos BF é a osteonecrose, que ocorre comumente nos ossos maxilares, possivelmente em decorrência da inibição da migração e adesão celular que pode atrapalhar o potencial de neoformação óssea após cirurgias dento alveolares (KOCH *et al.*, 2011).

No tecido ósseo dos maxilares de pacientes que utilizam BF, o reparo ocorre de forma lenta, favorecendo a colonização por bactérias patogênicas, podendo gerar osteomielite crônica devido à reabsorção lenta do tecido ósseo (TARDAST *et al.*, 2015). Estudos mostram que a incidência da osteonecrose dos maxilares em pacientes com neoplasia maligna óssea, tratados com BF intravenosos de dose elevada, varia de 1 a 12% (MARX *et al.*, 2005; RUGGIERO *et al.*, 2004). Nos pacientes em tratamento com BF para osteoporose, a osteonecrose dos maxilares é rara. Estima-se incidência de menos de 1 caso por 100.000 pessoas/ano em tratamento com BF orais (WANG; WEBER; MCCAULEY, 2007).

A etiologia da osteonecrose dos maxilares associada aos BF ainda é incerta (MARX *et al.*, 2005; NICOLATOU-GALITIS *et al.*, 2019). Estudos mostraram grande acúmulo de BF nos ossos maxilares. A alta concentração desses fármacos poderia influenciar as células no microambiente ósseo, como osteoblastos, células endoteliais e fibroblastos, afetando o reparo tecidual e resultando clinicamente em osteonecrose (WALTER *et al.*, 2010). A maioria dos pacientes que apresentaram osteonecrose dos maxilares utilizaram os medicamentos ácido zoledrônico e pamidronato (WOO *et al.*, 2006), enquanto somente alguns pacientes que utilizaram por longo tempo alendronato apresentaram este quadro (RUGGIERO *et al.*, 2004).

2.2 Doença periodontal

2.2.1 Características clínicas

As doenças periodontais são infecções multifatoriais resultantes da interação do biofilme disbiótico com os tecidos e células do hospedeiro, gerando a liberação de vários mediadores inflamatórios citocinas, quimiocinas o que pode levar a destruição das estruturas periodontais, gerando perda óssea e perda de inserção (HIGHFIELD, 2009; HOLT; EBERSOLE, 2005; LIU; LERNER; TENG, 2010).

Dentre as doenças periodontais associadas ao biofilme disbiótico, temos a periodontite que aparece em pessoas predispostas e com desregulação do sistema imunológico frente ao principal fator etiológico, o acúmulo de biofilme disbiótico, que gera inflamação dos tecidos periodontais (HAJISHENGALLIS; CHAVAKIS; LAMBRIS, 2020; VAN DYKE, 2020).

O equilíbrio entre as respostas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias são elementos chaves para a patogênese da doença periodontal e danos teciduais. Durante a inflamação dos tecidos periodontais, ocorre o recrutamento de células do sistema imune inato e adaptativo que pode progredir para uma fase de resolução ou para uma fase de inflamação crônica. Essas fases

podem ser afetadas por vários fatores ambientais, moleculares e celulares ligados ao hospedeiro, modulando o recrutamento e a atividade leucocitária e determinando a evolução clínica da doença. Se as células pró-inflamatórias forem dominantes, há maior tendência de ocorrer destruição tecidual e reabsorção óssea. E se as células anti-inflamatórias e pró-regenerativas forem dominantes, teremos uma resolução da inflamação e os tecidos serão reparados ou regenerados (GU; HAN, 2020; HAJISHENGALLIS; CHAVAKIS; LAMBRIS, 2020; VAN DYKE, 2020).

Este processo pode ser reversível, reduzindo-se o biofilme dental disbiótico por meio da remoção mecânica, e é considerado a terapia padrão para o tratamento da periodontite. (PRESHAW, 2018) A permanência do biofilme disbiótico gera uma maior liberação de fatores de virulência bacterianos, como os lipopolissacarídeos (LPS), causando a gengivite que apresenta sinais clínicos característicos como sangramento gengival, rubor e edema, gerando um processo inflamatório restrito ao tecido gengival. Se este processo não for interrompido, o biofilme disbiótico continuará se desenvolvendo podendo atingir os tecidos periodontais de sustentação, ligamento periodontal, osso alveolar e cemento radicular, caracterizando a periodontite (CHAPPLE *et al.*, 2018; GOUTOUDI; DIZA; ARVANITIDOU, 2004).

O diagnóstico da doença periodontal é feito através de exame clínico utilizando uma sonda milimetrada, que avalia alterações dentro do sulco periodontal auxiliando o planejamento do tratamento periodontal. Alguns parâmetros são utilizados para verificar alterações nos tecidos periodontais, como profundidade de sondagem (PS), nível de inserção clínica (NIC) e sangramento a sondagem (SS) (LINDHE; LANG, 2018; NEWMAN *et al.*, 2020). Os principais sinais clínicos de inflamação observados na periodontite são edema que altera a forma, contorno, textura, tamanho e cor da gengiva, perda clínica de inserção, presença de bolsas periodontais, sangramento a sondagem e em alguns casos supuração (PAPAPANOU *et al.*, 2018; TONETTI; GREENWELL; KORNMAN, 2018).

A periodontite é definida como uma doença inflamatória crônica com vários fatores etiológicos relacionados ao biofilme dental disbiótico, que gera a destruição gradativa de todos os tecidos de suporte periodontal. Recentemente, uma nova classificação para a doença foi proposta com base na severidade (NIC) e na progressão (PAPAPANOU *et al.*, 2018; TONETTI; GREENWELL; KORNMAN, 2018).

A periodontite na forma moderada afeta aproximadamente 45% a 50% da população mundial (GENCO; SANZ, 2020), podendo se apresentar de forma localizada, quando atinge até 30% dos sítios, ou generalizada, quando encontrada em mais de 30% dos sítios periodontais (PAPAPANOU *et al.*, 2018; TONETTI; GREENWELL; KORNMAN, 2018).

A presença constante de biofilme dental disbiótico em contato com os tecidos periodontais gera um processo inflamatório recorrente, determinando o percurso da doença periodontal (KINANE; STATHOPOULOU; PAPAPANOU, 2017). O processo imunoinflamatório na doença periodontal é regulado por vários mediadores pró e anti-inflamatórios que vão afetar a progressão da doença periodontal. Um equilíbrio na secreção local de citocinas inflamatórias pode garantir a preservação dos tecidos periodontais (ROBERTS; DARVEAU, 2015), enquanto um desequilíbrio, induzido principalmente pela presença constante de biofilme disbiótico, pode levar à destruição dos tecidos periodontais (VAN DYKE; SERHAN, 2003).

O tratamento da gengivite e periodontite baseia-se na remoção do biofilme disbiótico, orientação de higiene bucal e acompanhamento clínico periódico. Com a remoção do biofilme disbiótico espera-se que a inflamação seja controlada e os tecidos periodontais voltem a ter saúde (LINDHE; LANG, 2018). A ausência de sinais de processos inflamatórios no periodonto, como edema, eritema, sangramento e supuração, caracteriza a saúde periodontal e sua manutenção é essencial para o funcionamento e preservação de todos os tecidos periodontais (CHAPPLE *et al.*, 2018).

2.2.2 Periodontopatógenos e resposta imunoinflamatória periodontal

O biofilme disbiótico é constituído por numerosas espécies bacterianas, que interagem entre si para criar um meio propício à sobrevivência e proliferação microbiana. Diversos estudos mostraram espécies bacterianas chave para o aparecimento e progressão da periodontite como *Porphyromonas gingivalis* (SOCHALSKA; POTEMPA, 2017), *Tannerella forsythia* (MAHALAKSHMI; KRISHNAN; CHANDRASEKARAN, 2018) e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (AKRIVOPOULOU *et al.*, 2017), embora várias outras espécies também apresentem importantes fatores de virulência para a doença (ATA-ALI *et al.*, 2015). Os microrganismos do biofilme dental disbiótico são capazes de produzir substâncias lesivas como o LPS, que estimulam a produção de mediadores inflamatórios pelas células do sistema imunológico, iniciando a progressão das doenças periodontais (KANTRONG; TO; DARVEAU, 2019). Os periodontopatógenos também produzem toxinas capazes de destruir os tecidos periodontais (KINANE; STATHOPOULOU; PAPAPANOU, 2017). O biofilme disbiótico é organizado com uma estrutura complexa, onde existe a cooperação e coagregação entre as bactérias, o que acelera o crescimento do biofilme dental e serve como mecanismo de

defesa e de evasão do sistema de defesa do hospedeiro (ALBANDAR, 2002; JAKUBOVICS *et al.*, 2021).

A presença de Pg no biofilme está intimamente relacionada aos danos teciduais na doença periodontal. Dentre os mecanismos de virulência apresentados pela Pg, podemos destacar a produção de enzimas proteolíticas e a expressão de adesinas, denominadas gingipains, as quais auxiliam na adesão, aquisição de nutrientes e evasão do sistema imunológico do hospedeiro (OLCZAK *et al.*, 2005; POTEMPA; PIKE, 2009; SHEETS *et al.*, 2008; ZHU *et al.*, 2013).

Um estudo *in vitro* sobre a interação patógeno e hospedeiro mostrou que estimulação com Pg induz aumento significativo da produção de espécies reativas do oxigênio (ROS) e aumento de cerca de 33 vezes na produção da quimiocina interleucina-8 (IL-8) por neutrófilos (JAYAPRAKASH *et al.*, 2015). Outro estudo mais antigo demonstrou que a estimulação de neutrófilos circulantes de pacientes com periodontite agressiva com LPS de Pg aumentou significativamente a resposta dessas células e a produção de ROS (SHAPIRA; WARBINGTON; VAN DYKE, 1994). Ling, Chapple e Matthews (2015) observaram que neutrófilos de pacientes com periodontite crônica exibiram hiperatividade e liberaram mais citocinas pró-inflamatórias na presença de Pg que neutrófilos de indivíduos saudáveis, sugerindo que a presença deste periodontopatógeno estimula a liberação de mediadores inflamatórios responsáveis pela progressão da doença periodontal.

Durante a progressão da periodontite as respostas imunes inatas e adaptativas do hospedeiro são ativadas e, diante do complexo sistema de interação entre patógenos e hospedeiro, são liberados inúmeros mediadores inflamatórios que afetam diretamente o curso da doença (PRESHAW; TAYLOR, 2011). Diversas citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral (TNF), interferon-gama (IFN- γ), interleucina-1 β (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6), interleucina-12 (IL-12) e interleucina-17 (IL-17), e citocinas anti-inflamatórias, como interleucina-10 (IL-10) e interleucina-4 (IL-4), participam desse processo (DUARTE *et al.*, 2015). O curso clínico da doença periodontal é influenciado pela resposta do hospedeiro aos produtos bacterianos e as variações no curso da doença podem ocorrer devido a fatores de risco individuais, que podem ser comportamentais, sistêmicos ou genéticos (CANDEL-MARTÍ *et al.*, 2011; KINANE; STATHOPOULOU; PAPAPANOU, 2017).

As células presentes na resposta imune inata apresentam receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), que identificam padrões moleculares gerais encontrados nos patógenos (padrões moleculares associados a patógenos, PAMPs) (MYSAK *et al.*, 2014). O LPS é um componente da parede celular das bactérias Gram-negativas e um exemplo de PAMP. As

células do sistema imune inato utilizam os TLRs (*toll like receptors*), para reconhecimento de LPS e inicialização da resposta imune protetora (ALQALLAF *et al.*, 2018; ILANGO *et al.*, 2016; ZHANG; LI, 2015).

O LPS de Pg pode ser reconhecido por diversas células do periodonto, como fibroblastos, macrófagos, células epiteliais e endoteliais. TLR2 e TLR4 são os principais receptores da resposta imune inata para o reconhecimento de componentes da parede celular de bactérias gram-negativas, como o LPS de Pg, participando ativamente da patogênese da periodontite (GADDIS; MICHALEK; KATZ, 2009; HAROKOPAKIS; HAJISHENGALLIS, 2005; HERATH *et al.*, 2013; MAHANONDA *et al.*, 2007; MATERA *et al.*, 2009), por estimular a produção de citocinas pró e anti-inflamatórias que iniciam os processos inflamatórios (SCHAEFER *et al.*, 2004; UEHARA; TAKADA, 2007). O reconhecimento de LPS por macrófagos exige a ligação ao TLR4 em sinergismo com os receptores CD14 e MD-2 (NAGAI *et al.*, 2002).

Estudos mostraram que LPS de *P. gingivalis* pode se ligar tanto a TLR2 quanto a TLR4, mas com afinidades e respostas celulares diferentes. Burns *et al.* (2006), utilizando camundongos deficientes para TLR2 ou para TLR4 estimulados com Pg, mostraram que alta produção de citocinas é dependente de TLR2. Outro estudo mostrou que são necessárias grandes concentrações de LPS de Pg para ativação celular via TLR4, enquanto concentrações baixas ou altas de LPS são capazes de ativar as células via TLR2 (LIN *et al.*, 2017). Quando existe a combinação de lipídio-A com gingipains ou peptideoglicanos, a ativação do TLR4 pode ser facilitada (SUN *et al.*, 2010). A ativação de TLR4 pode induzir leucócitos a estimular outras células como os fibroblastos gengivais a produzirem citocinas como a IL-1 (WANG *et al.*, 2000). Devido à dificuldade de ativação do TLR4, estudos sugerem que o LPS de *P. gingivalis* pode atuar como um agonista fraco e até como um antagonista do receptor TLR4, modulando a ativação da resposta imune (JAIN; DARVEAU, 2010). Entretanto, durante a progressão da doença periodontal, TLR4 é necessário para ocorrência de perda óssea, como demonstrada em um estudo em camundongos (LIN *et al.*, 2017). Foi demonstrado ainda que LPS de *P. gingivalis* ativa diferentemente a via de sinalização NF-kB mediada por TLR4 e modula a produção de IL-6 e interleucina- 8 (IL-8) em fibroblastos gengivais humanos (HERATH *et al.*, 2013). Em macrófagos expostos ao LPS de *P. gingivalis*, TLR2 estimula muito a produção de citocinas, mas a ativação de TLR2 e TLR4 concomitantemente aumenta ainda mais essa produção (ZHOU *et al.*, 2005).

O controle dos processos imunoinflamatórios nos tecidos periodontais envolve a produção de citocinas por diversos tipos celulares. As citocinas são polipeptídios

multifuncionais que atuam como fatores de regulação intercelular tanto em nível local como sistêmico. São produzidas principalmente por células do sistema imunológico, como neutrófilos, monócitos macrófagos e linfócitos T, em regiões com inflamação tecidual. Outros tipos celulares do tecido periodontal, como fibroblastos e células endoteliais, também produzem citocinas durante a resposta inflamatória. A saúde periodontal depende do equilíbrio local entre a produção de diversas citocinas, as quais estão envolvidas no combate aos microrganismos, proteção e destruição tecidual (TAMAI; SUGIYAMA; KIYOURA, 2011).

Diversos estudos apontam as citocinas como importantes mediadores associados à patogênese da periodontite. Produtos bacterianos, como LPS da parede celular das bactérias Gram-negativas, induzem a síntese de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α , principalmente por macrófagos (AGARWAL *et al.*, 1995; BORMANN *et al.*, 2010). A IL-1 β tem um papel importante na resposta imunológica inata, regulando a diapedese de granulócitos e estimulando a síntese de prostaglandina (PGE₂) e de metaloproteinases de matriz (MMP) pelos fibroblastos, as quais estão envolvidas na destruição da matriz extracelular do tecido conjuntivo fibroso e do osso alveolar (BORMANN *et al.*, 2010). O TNF- α é uma das citocinas mais importantes no processo inflamatório da periodontite, estimulando a reabsorção óssea e a ativação de várias células (WANG *et al.*, 2017). Em osteoblastos maduros, o TNF- α inibe a expressão de genes necessários para a formação óssea e induz a expressão de genes que estimulam a osteoclastogênese e ativam osteoclastos maduros (WANG *et al.*, 2017). Ambas, IL-1 β e TNF- α induzem a expressão de moléculas de adesão na superfície endotelial, estimulando a diapedese leucocitária e contribuindo para o estabelecimento do infiltrado inflamatório tecidual (TURNER *et al.*, 2014). A citocina IL-6 também é encontrada em níveis elevados em sítios com doença periodontal (SHAO *et al.*, 2009) e atua induzindo reabsorção óssea (SCHIERANO *et al.*, 2000). A IL-12, produzida principalmente por macrófagos e células dendríticas, estimula células natural killer (NK) e linfócitos T a produzirem interferon-gama, uma potente citocina responsável pelo aumento da capacidade microbicida de macrófagos (TURNER *et al.*, 2014). Além disso, estimula a diferenciação de linfócitos Th1, importantes no combate a microrganismos intracelulares (SHARMA *et al.*, 2014).

As quimiocinas são um grupo de citocinas com função de recrutar e ativar leucócitos por meio da ligação a proteínas G específicas acopladas a receptores transmembrana de superfície celular (MURPHY, 1994). São produzidas por várias células no periodonto como fibroblastos, células endoteliais, macrófagos, osteoclastos, células epiteliais, leucócitos polimorfonucleares, monócitos, linfócitos e mastócitos (SILVA *et al.*, 2007). Além de recrutar

leucócitos do sangue, as quimiocinas também modulam a ação dos osteoclastos (GRAVES, 2008).

A quimiocina CCL-2 é uma das mais potentes indutoras do recrutamento de monócitos do sangue para o tecido extravascular (DEZERECA *et al.*, 2010; HANAZAWA *et al.*, 1993). Nos tecidos com doença periodontal, a CCL-2 é produzida por células endoteliais, fibroblastos e fagócitos mononucleares (LEONARD; YOSHIMURA, 1990). Os níveis desta quimiocina ficam aumentados no fluido crevicular em pacientes com doença periodontal severa (YU; ANTONIADES; GRAVES, 1993).

Outra quimiocina envolvida na doença periodontal é a IL-8, a qual é secretada por diversas células nos tecidos periodontais como macrófagos, monócitos, neutrófilos, células endoteliais e fibroblastos gengivais. Atua como potente citocina quimiotática e ativadora de neutrófilos, além de estimular a formação de osteoclastos (FINOTI *et al.*, 2017). Embora exposição inicial ao LPS de *P. gingivalis* estimule a produção de IL-8 por monócitos, foi demonstrado que a reestimulação dessas células com o LPS reduz a produção dessa citocina (MUTHUKURU; JOTWANI; CUTLER, 2005).

Ao contrário das citocinas descritas anteriormente, a IL-10 exerce efeito anti-inflamatório, limitando as respostas imunes e reduzindo os danos teciduais (ROMAGNANI, 2002). Inibe a secreção das citocinas IL-1, IL-6, IL-8 e TNF- α e a expressão de moléculas co-estimulatórias e apresentadoras de antígenos em diferentes tipos celulares (ATA-ALI *et al.*, 2015; ROMAGNANI, 2002; SCHIERANO *et al.*, 2000). A IL-10 inibe ainda a atividade de macrófagos e linfócitos T, a geração de radicais livres, a osteoclastogênese e a angiogênese (ROMAGNANI, 2002).

Vários estudos revelaram o aumento na produção de TNF- α , IL-1 β e IL-10 por macrófagos após estimulação com Pg ou com seus fatores de virulência (HOLDEN *et al.*, 2014; KIM *et al.*, 2018; SUN *et al.*, 2012; SUN *et al.*, 2014). Entretanto, a exposição de macrófagos a diferentes fatores de virulência de *Pg* isoladamente ou à célula microbiana inteira pode determinar efeitos biológicos diferentes (BAEK *et al.*, 2015; EICK *et al.*, 2006). Além disso, esses autores verificaram que a estimulação de macrófagos por LPS de *P. gingivalis* não foi capaz de aumentar a expressão de TLR2 e TLR4 por essas células.

A estimulação bacteriana nos tecidos periodontais é persistente no desenvolvimento da periodontite e a exposição do sistema imunológico a patógenos, pode induzir um estado de hiporresponsividade a estímulos subsequentes, conhecido como tolerância a endotoxinas. A tolerância à endotoxina é uma reprogramação do sistema imunológico, que resulta em

diminuição dos níveis de citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF- α e IL-1 β e aumento das citocinas anti-inflamatórias como a IL-10 (XIONG *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2012).

A inibição da liberação excessiva de mediadores inflamatórios pode ser utilizada para restringir a lesão imune e manter a homeostase periodontal. Este é um mecanismo protetor na progressão da periodontite. Mas a diminuição de mediadores inflamatórios pode comprometer a capacidade do hospedeiro resistir as bactérias (MEDVEDEV *et al.*, 2006).

2.2.3 Fagócitos na doença periodontal

Quando ocorre qualquer injúria aos tecidos periodontais os neutrófilos maduros são os primeiros leucócitos a serem recrutados do sangue, concentrando-se na região do sulco gengival (COOPER; PALMER; CHAPPLE, 2013). Uma variedade de fatores quimiotáticos produzidos pelas células do periodonto, como leucotrieno B₄, C_{5a}, IL-8, além de peptídeos antibacterianos são responsáveis por provocar uma rápida neutrofilia, aumentar a adesão ao endotélio dos vasos, induzir a diapedese e atrair os neutrófilos para o local da infecção (BORREGAARD, 2010; FURZE; RANKIN, 2008).

Ao fagocitarem microrganismos, os neutrófilos liberam grânulos citoplasmáticos contendo enzimas e mediadores inflamatórios, geram ROS e produzem citocinas que contribuem para o combate aos periodontopatógenos, ativação de monócitos e linfócitos T, o que amplifica a cascata de sinais e afeta os neutrófilos (SCOTT; KRAUSS, 2012; SHIN; CHOI, 2008).

Os neutrófilos exercem suas funções antimicrobianas através da fagocitose, onde o microrganismo é englobado em um fagossomo e, depois, enzimas líticas são liberadas causando sua destruição. Esta eliminação microbiana pelos fagócitos também ocorre por meio da produção de ROS pela enzima NADPH oxidase. Além de seu ataque oxidativo direto, os radicais de oxigênio podem modular várias atividades celulares que são importantes mediadores na sequência de eventos que causam danos aos tecidos (KANTARCI; OYAIZU; VAN DYKE, 2003). A detecção de produtos da explosão respiratória por neutrófilos pode ser realizada por meio da incubação com dihidrorodamina 123 (DHR123), um substrato que é oxidado pelo peróxido de hidrogênio, gerando rodamina fluorescente (RICHARDSON *et al.*, 1998).

A explosão respiratória em neutrófilos é uma importante estratégia de defesa do hospedeiro contra o *Pg* que é um iniciador da explosão respiratória e causa o aumento de ROS por neutrófilos (AL-SHIBANI *et al.*, 2011; GÖLZ *et al.*, 2014). Durante a explosão respiratória

em neutrófilos ocorrem várias reações nas quais os íons superóxidos são gerados pela atividade de NADPH oxidase. Em seguida, esses íons são metabolizados em peróxido de hidrogênio, ácido hipocloroso, radicais hidroxila e outros. Os produtos finais desta reação são extremamente tóxicos para os microrganismos e podem gerar danos nos tecidos (EL-BENNA; DANG; GOUGEROT-POCIDALO, 2008; KOVÁCS *et al.*, 2014; MOREL; DOUSSIERE; VIGNAIS, 1991). A liberação desses produtos antimicrobianos deve ocorrer de maneira controlada para não ocasionar danos aos tecidos do hospedeiro (SCOTT; KRAUSS, 2012; SHIN; CHOI, 2008). Estudos sugerem que a progressão da doença periodontal pode estar associada a resposta descontrolada dos neutrófilos em indivíduos susceptíveis (JAYAPRAKASH *et al.*, 2015).

Outra forma de defesa dos neutrófilos é através da produção de exsudatos extracelulares, chamados de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs), em uma tentativa de reduzir infecções por bactérias aprisionadas nos tecidos (BRINKMANN *et al.*, 2004). Os NETs apresentam em sua composição histonas bactericidas, defensinas, elastase, proteína de ligação à heparina, catepsina G, lactoferrina e mieloperoxidase (SCOTT; KRAUSS, 2012; URBAN *et al.*, 2009). Alguns dos componentes dos NETs são produzidos durante a fagocitose e ampliam o espectro antimicrobiano extracelular (BRINKMANN *et al.*, 2004). Os NETs são induzidos por produtos microbianos, complexos imunes, autoanticorpos e citocinas (CXCL8, TNF e interferons) (KAPLAN; RADIC, 2012).

Neutrófilos expressam em suas membranas um grupo de moléculas denominadas CD66 (SKUBITZ; CAMPBELL; SKUBITZ, 1996). A glicoproteína CD66b é altamente expressa na superfície de granulócitos e se liga a um ligante específico, galactina-3, que induz forte adesão celular, geração de superóxidos e desgranulação (YOON; TERADA; KITA, 2007). A sensibilização de CD66b ativa neutrófilos e induz aumento de cálcio intracitoplasmático e explosão oxidativa (LUND-JOHANSEN *et al.*, 1993), exocitose de grânulos específicos (DUCKER; SKUBITZ, 1992) e liberação de citocinas pró-inflamatórias (BEAUCHEMIN *et al.*, 1999; SCHRÖDER *et al.*, 2006). A iniciação da explosão respiratória em neutrófilos depende da sinalização de CD66.

O CD66b glicosilado pode ser um receptor para moléculas do tipo lectinas geradas por células inflamatórias. Macrófagos e mastócitos liberam galectina-3 que induz a produção de mediadores pró-inflamatórios por eosinófilos através do CD66b (FRIGERI; LIU 1992; LIU *et al.*, 1995). O CD66b interage com outras moléculas da membrana, formando complexos de macromoléculas envolvidos na sinalização intracelular e ativação de granulócitos (HAMMARSTROM, 1999).

A desgranulação de neutrófilos libera várias enzimas, como a elastase e a collagenase, que podem degradar elastina, colágeno, proteínas da matriz extracelular e fibronectina (HENSON; JOHNSTON, 1987). Os fragmentos de peptídeos liberados pela degradação dos componentes da matriz extracelular promovem a quimiotaxia de monócitos, potencializando ainda mais o processo imunoinflamatório (KANTARCI; OYAIZU; VAN DYKE, 2003).

Os macrófagos são umas das células mais importantes para a defesa contra os patógenos periodontais (LIU *et al.*, 2014; RUCKERL; ALLEN, 2014; YANG *et al.*, 2014). Os monócitos migram da corrente sanguínea para os tecidos infectados onde se tornam macrófagos e são ativados pelas bactérias periodontais e seus produtos. Depois da ativação dos macrófagos ocorre a fagocitose das bactérias e liberação de proteases como MMPs e collagenases, que danificam o tecido conjuntivo periodontal. Os monócitos também liberam prostaglandina (PGE₂) e citocinas, como IL-1, IL-6, que promovem a maturação dos osteoclastos e reabsorção óssea alveolar (ARANGO; DESCOTEAUX, 2014; CHARON; TOTO; FINE, 2009; GARGIULO, 1981).

Os monócitos também contribuem para a destruição dos tecidos periodontais, secretando altos níveis de MMP, ROS, TNF, IL-1, IL-6 e RANK-L, que amplificam a resposta inflamatória para controlar a infecção bacteriana, mas ocasionam destruição dos tecidos periodontais (CROTTI *et al.*, 2015; KAYAL, 2013; SEGUIER *et al.*, 2001; VARANAT *et al.*, 2017).

Os monócitos desempenham função importante no processo imunoinflamatório, homeostase e reparo tecidual em diferentes processos patológicos (BOYETTE *et al.*, 2017). A existência de diferentes subpopulações de monócitos no sangue humano já está bem estabelecida e essas podem ser identificadas fenotipicamente pela expressão dos marcadores CD14 e CD16 (ZIEGLER-HEITBROCK *et al.*, 2010). Assim, subtipos de monócitos são classificados como clássicos (CD14⁺CD16⁻), que representam de 80-90% dos monócitos do sangue periférico, intermediários (CD14⁺CD16⁺) e não clássicos (CD14^{low}CD16⁺) e estas células têm mostrado fenótipo e função distintos, com perfis de produção de citocinas e potencial de apresentação de antígenos diferentes (BOYETTE *et al.*, 2017; ZIEGLER-HEITBROCK, 2007; ZIEGLER-HEITBROCK *et al.*, 2010). Monócitos clássicos são menos diferenciados, enquanto os monócitos não clássicos são derivados de monócitos clássicos e são mais maduros (ZIEGLER-HEITBROCK *et al.*, 2010), respondem de forma deficiente a sinais bacterianos e são mais responsivos a sinais associados a vírus (CROS *et al.*, 2010). O padrão de antígenos de superfície dos monócitos não clássicos se assemelha em muitos aspectos ao padrão observado em macrófagos nos tecidos (PASSLICK; FLIEGER; ZIEGLER-

HEITBROK, 1989). Adicionalmente, monócitos intermediários apresentam perfil mais pró-inflamatório, alta expressão de citocinas pró-inflamatórias e capacidade de apresentação de antígenos (ZIEGLER-HEITBROK, 2007).

O tempo de vida dos monócitos é curto e foi demonstrado que monócitos não clássicos vivem tempo maior que os clássicos. Monócitos não clássicos acumulam-se em locais de infecção crônica e produzem baixos níveis de citocinas pró-inflamatórias e altos níveis de citocinas anti-inflamatória (THOMAS *et al.*, 2015). Com base em suas características fenotípicas e funcionais, os macrófagos também são classificados como macrófagos pró-inflamatórios (M1) e macrófagos anti-inflamatórios ou de resolução (M2) (MARTINEZ; GORDON, 2014)

O subtipo M1 está associado com produção de IL-12 e IL-8 e ativam linfócito T auxiliares do tipo 1 (Th1), enquanto os macrófagos M2 estão associados à produção de fator de crescimento transformador beta (TGF- β), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e fator de crescimento epidérmico (EGF) e ativação de linfócitos T auxiliares do tipo 2 (LTh2), um subtipo linfocitário secretor de citocinas anti-inflamatórias (ALBINA *et al.*, 1989; MILLS 2001; MILLS, 2012; MILLS 2015). Após agressão, os macrófagos alcançam os tecidos extravasculares por meio da diapedese e, inicialmente, a ativação dos macrófagos M1 leva a produção de TNF e IL-12, contribuindo para a ativação dos processos inflamatórios (ITALIANI; BORASCHI, 2014). Já na fase de resolução do processo inflamatório, os macrófagos M2 são ativados e secretam IL-10, TGF- β e outros fatores de crescimento, como VEGF, que induzem angiogênese e produção da matriz extracelular, contribuindo para o reparo tecidual (DAS *et al.*, 2015; MARTIN; LEIBOVICH, 2005; SERHAN, 2007).

Um estudo avaliando subpopulações de monócitos e macrófagos em tecidos periodontais de indivíduos com e sem doença periodontal mostrou maior prevalência de monócitos intermediários e não clássicos em tecidos afetados pela periodontite. Mostrou ainda maior prevalência de macrófagos M1 em relação a M2 em pacientes com periodontite, o que pode diminuir a reparação tecidual no local (ALMUBARAK *et al.*, 2020).

2.3 Efeitos dos bisfosfonatos em células imunocompetentes

Os bisfosfonatos podem ter efeitos diretos em células da linhagem dos monócitos e macrófagos *in vivo*. Por possuírem um grupo fosfato com carga negativa, os BF não conseguem atravessar a membrana plasmática das células, necessitando serem endocitados para a sua absorção celular (THOMPSON *et al.*, 2006). Após a internalização em vesículas endocíticas, a

acidificação dessas vesículas permite a liberação dos BF para o citosol. Estudos *in vitro* mostram que células altamente endocíticas, tais como macrófagos e monócitos, apresentam maiores níveis de absorção intracelular e são mais sensíveis às ações dos BF. Em menor proporção, outras células como linfócitos, osteoblastos e células do câncer de mama também sofrem efeito dos BF (ROELOFS *et al.*, 2009). Além dos osteoclastos, monócitos e macrófagos na medula óssea também mostraram absorção de BF detectável por análogos de risedronato fluorescente *in vivo* (CHANG *et al.*, 2008).

Estudos mostraram que as duas principais classes de BF têm diferentes efeitos diretos na produção de citocinas por células monocíticas/macrofágicas. Em macrófagos RAW 264 ativados por LPS de *Escherichia coli*, os BF não nitrogenados, clodronato na concentração de 110 mM e etidronato na concentração 1000 mM, reduziram a produção de IL-1 β e IL-6, enquanto os BF nitrogenados, alendronato 100 mM e pamidronato 300 mM, aumentaram a produção dessas citocinas (MAKKONEN *et al.*, 1999; PENNANEN *et al.*, 1995; TÖYRÄS *et al.*, 2003). Outro estudo mostrou que a adição de zoledronato a 25 ug/ml aumentou significativamente a expressão de IL-1 β por macrófagos RAW 264 (YANG *et al.*, 2020). Estudos em modelos animais mostraram que a administração de alendronato na concentração de 40 μ M/kg de peso corporal foi capaz de aumentar a produção de IL-1 α e IL-1 β na cavidade peritoneal de camundongos estimulados por LPS de *E. coli* (SUGAWARA *et al.*, 1998). Adicionalmente, um estudo com camundongos mostrou que alendronato, a 40 μ M/Kg peso corporal, foi capaz de aumentar a produção de IL-1 β em diversos órgãos, como fígado, pulmão e baço, sem, contudo, alterar sua concentração no plasma (DENG *et al.*, 2005). Outro estudo mostrou que BF nitrogenados induzem aumento da concentração das citocinas IL-1 α e IL-1 β no plasma de camundongos BALB/c estimulados com LPS de *E. Coli* ou de *Prevotella intermedia*, embora a adição desses BF na ausência de LPS não tenha sido capaz de afetar os níveis dessas citocinas no plasma dos camundongos (YAMAGUCHI *et al.*, 2000).

Em humanos, a administração de alendronato 70mg via oral ou de ácido zoledrônico 5mg endovenoso leva ao aumento na concentração das citocinas pró-inflamatórias IL-1 α , IL-1 β , IL-6 e TNF- α no plasma sanguíneo, em curto prazo (TALAAT *et al.*, 2015), embora a administração prolongada possa suprimir essa produção (VON KNOCH *et al.*, 2005).

Um estudo em macacos mostrou que a utilização de doses de 0,25 mg/kg de alendronato intravenoso como terapia complementar na inibição de perda óssea na periodontite, induziu maior produção das citocinas IL-1 β e IL-6 nos tecidos periodontais, prejudicando o controle da inflamação periodontal (WEINREB *et al.*, 1994).

2.4 Utilização tópica dos bisfosfonatos no tratamento periodontal

Estudos em humanos mostraram que a utilização do alendronato por via sistêmica ou tópica, como coadjuvante no tratamento periodontal, contribui para a diminuição da profundidade de sondagem e da mobilidade dental (BADRAN *et al.*, 2009; CHEN *et al.*, 2016).

Diversos estudos avaliaram os efeitos do uso tópico de Ale como adjuvante no tratamento periodontal não cirúrgico. Foram observadas reduções no sangramento à sondagem, perda de inserção clínica e profundidade de sondagem, após a sua utilização (DUTRA *et al.*, 2017; PRADEEP *et al.*, 2012; PRADEEP *et al.*, 2013).

Um estudo avaliando 73 pacientes com periodontite crônica e idades entre 30 e 50 anos mostrou que a utilização tópica de alendronato na forma de gel a 1%, durante 6 meses, promoveu redução significativa na profundidade de sondagem e melhoria do nível de inserção clínica (SHARMA; PRADEEP, 2012). Outro estudo do mesmo grupo de pesquisa avaliou a utilização tópica do Ale na forma de gel a 1% no tratamento da periodontite crônica em 52 mulheres tabagistas, de 30 a 50 anos, durante 2 e 6 meses de tratamento. Os resultados mostraram que a utilização do Ale melhorou significativamente os padrões clínicos e radiográficos no controle da doença periodontal quando comparado ao placebo. Os pacientes não fizeram utilização de antibióticos ou antiinflamatórios (SHARMA; RAMAN; PRADEEP, 2017).

Outro estudo, também utilizando Ale tópico na forma de gel a 1%, durante um período de 6 meses, em pacientes de 30 a 50 anos, fumantes e não fumantes, com periodontite crônica, mostrou melhora nos parâmetros clínicos e radiográficos da doença periodontal quando comparado ao placebo. Nesse estudo, pacientes não fumantes obtiveram melhores índices clínicos e radiográficos de saúde periodontal do que pacientes fumantes, após utilização tópica do Ale (SHEOKAND; CHADHA; PALWANKAR, 2019).

A administração tópica de gel de Ale a 1% no tratamento de pacientes com periodontite crônica e diabetes mellitus também promoveu, após 2 e 6 meses, melhora no nível de inserção clínica e diminuição da profundidade de sondagem quando comparada ao grupo placebo (PRADEEP *et al.*, 2012).

Em pacientes com periodontite agressiva, a utilização tópica de Ale em gel a 1% como adjuvante do tratamento por meio de raspagem e alisamento radicular em 52 defeitos ósseos mostrou melhora significativa dos parâmetros clínicos e radiográficos, como profundidade de sondagem, nível de inserção clínica e ganho ósseo nos defeitos, após 2 e 6 meses, em comparação com os defeitos que receberam o placebo (SHARMA; PRADEEP, 2012).

Resultados positivos também foram encontrados para a utilização tópica do gel de Ale a 1% como adjuvante no tratamento cirúrgico da periodontite. Um estudo avaliando 32 pacientes mostrou melhoria significativa no sangramento a sondagem, profundidade de sondagem e nível de inserção clínica após 2 e 6 meses de tratamento com alendronato, quando comparado ao grupo placebo (DUTRA *et al.*, 2017).

Mais recentemente, um estudo envolvendo 40 pacientes com idades entre 30 e 50 anos, avaliou o efeito tópico de outro BF, o ácido zoledrônico, em gel a 0,05% como adjuvante no tratamento da doença periodontal. Após 6 meses, o grupo tratado com ácido zoledrônico também mostrou melhoria significativa nos parâmetros clínicos: profundidade de sondagem, índice de placa, nível de inserção clínica e nível de gengiva inserida (GUPTA *et al.*, 2018).

O uso tópico dos BF como terapia complementar no tratamento de doenças periodontais e periimplantares mostra-se promissor, embora haja escassez de estudos avaliando efeitos dessas drogas na atividade de células que participam dos processos inflamatórios periodontais. Além disso, a utilização tópica de BF apresenta benefícios, pois gera menor exposição da droga ao tecido ósseo, evitando o surgimento de osteonecrose dos maxilares, como ocorre em casos de administração sistêmica (PRADEEP *et al.*, 2012; SOILEAU, 2006).

3 HIPÓTESES

A utilização tópica de alendronato a 1% como adjuvante no tratamento da doença periodontal tem mostrado efeitos significativos na melhoria de parâmetros clínicos e radiográficos. Entretanto, como os bisfosfonatos também atuam em células não osteoclásticas, como os fagócitos, as quais participam ativamente dos mecanismos de combate aos microrganismos periodontopatogênicos e de manutenção da integridade tecidual, torna-se relevante o estudo dos efeitos dessas drogas na atividade dessas células. Na literatura há escassez de estudos avaliando os efeitos celulares e moleculares do Ale em células imunocompetentes estimuladas com periodontopatógenos.

As hipóteses testadas neste trabalho foram: (1) concentração de uso tópico de Ale a 1% reduz significativamente a expressão de intermediários reativos do oxigênio e TLRs por granulócitos e monócitos humanos estimulados in vitro com *P. gingivalis*; (2) Ale a 1% reduz significativamente a produção de citocinas pró-inflamatórias e aumenta a de citocinas anti-inflamatórias em granulócitos e monócitos humanos estimulados com *P. gingivalis*; (3) Ale a 1% afeta de modo distinto a expressão de moléculas envolvidas na inflamação periodontal por granulócitos e monócitos estimulados e não estimulados com *P. gingivalis*; (4); Ale a 1% afeta de modo distinto a expressão dessas moléculas por diferentes subpopulações de monócitos humanos estimulados por *P. gingivalis*.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito do alendronato de sódio em concentração de 1% na atividade de granulócitos e monócitos humanos estimulados com *Porphyromonas gingivalis*.

4.2 Objetivos específicos

- a) avaliar a viabilidade celular de granulócitos e monócitos expostos a concentração de 1% de alendronato de sódio e estimulados *in vitro* com *P. gingivalis*;
- b) determinar e comparar o efeito do alendronato de sódio na produção de espécies reativas do oxigênio e na expressão de TLR2, TLR4 e das citocinas IL-1 β , IL-8, IL-10, TNF e TGF- β 1 por granulócitos e monócitos humanos estimulados e não estimulados com *P. gingivalis*, *in vitro*;
- c) determinar e comparar o efeito do alendronato de sódio na expressão das citocinas IL-1 β , IL-8, IL-10, TNF e TGF- β 1 por subpopulações de monócitos humanos estimulados e não estimulados com *P. gingivalis*, *in vitro*.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Alendronato de Sódio

Neste estudo foi utilizado alendronato de sódio (Rini Life Science Pvt. Ltda, India) (Ale) na concentração final de 1% (0,03M) nas culturas celulares. O Ale foi dissolvido em meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640) (Sigma Aldrich), momentos antes de sua utilização.

5.2 Preparo das bactérias

Amostra de *Porphyromonas gingivalis* (Pg) (ATCC® 33277™, Manassas, VA, USA) foi cultivada em meio *Brain Heart Infusion Agar* (BHI - Difco, Sparks, MD, USA), suplementado com 0.1% de hemina suína (Inlab Confiança, Diadema, SP, Brazil), 0.5% de extrato de levedura (Difco, Sparks, MD, USA) e 0.1% de menadiona (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), e enriquecido com 5% de sangue de carneiro (BHIA-S/E), pH 7.2. As bactérias foram incubadas por 5 dias em câmara de anaerobiose (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) com atmosfera de 85% de N₂, 5% CO₂ e 10% H₂, a 37°C. As colônias foram transferidas para tubos contendo solução salina, homogeneizadas e ajustadas para um OD_{600nm} de 0,9 em espectrofotômetro (Micronal, S. A., SP, Brazil). As bactérias foram então lavadas com PBS e inativadas por meio de aquecimento a 100°C, por 30 minutos. As amostras foram mantidas a -80°C para utilização nos experimentos.

5.3 Amostras de sangue

Cerca de 20 mL de sangue foram coletados de dez doadores voluntários saudáveis através de punção de veia periférica, utilizando-se tubos contendo heparina (Becton Dickinson Vacutainer®, USA). Os critérios de exclusão foram: indivíduos com imunossupressão, doença periodontal, doença infecciosa sistêmica, tabagistas, etilistas crônicos, doença autoimune, doenças inflamatórias crônicas ou que estiveram realizando tratamento com quimioterápicos, antineoplásicos, drogas antibióticas, imunossupressoras ou anti-inflamatórias nos últimos 30 dias. Todos os voluntários foram examinados clinicamente para verificar a ausência de doença periodontal. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia

Universidade Católica de Minas Gerais (CAAE: 61550216.0.0000.5137) e conduzido de acordo com as normas vigentes.

5.4 Tratamento com alendronato de sódio e estimulação com *P. gingivalis*

Com base na concentração de alendronato de sódio utilizada clinicamente no tratamento periodontal, foi definida a concentração final de 1% (0,03M) nas culturas de curta duração. Experimentos prévios realizados pelo nosso grupo de pesquisa mostraram que essa concentração não afeta significativamente a viabilidade celular de granulócitos e monócitos humanos. Amostras de 1mL de sangue de cada doador foram transferidas para tubos de polipropileno e, em seguida, foi adicionado Ale em concentração final de 1%. As amostras foram mantidas em estufa a 37°C, 5% CO₂, por 2 horas. Em seguida, foi adicionado *Pg* em concentração final de 5x10⁵ UFC/mL e as amostras incubadas por mais 6 horas em estufa de CO₂. A concentração de *Pg* para estimulação leucocitária foi determinada previamente pelo nosso grupo de pesquisa. Quatro horas antes do final da incubação, nos tubos destinados à imunomarcagem de citocinas em todos os grupos experimentais, foi adicionada Brefeldina A (1 µg/ml) (eBioscience, San Diego, CA, USA), a qual inibe o transporte de vesículas intracelulares, concentrando as citocinas do complexo de Golgi e permitindo a detecção das citocinas imunomarcadas.

Ao final dos tratamentos, as amostras de sangue foram transferidas para tubos cônicos de 50 mL e foram adicionados 20 mL de solução de lise (8,26 g/L NH₄Cl; 1g/L KHCO₃; 37,2 mg/L Na₂EDTA), para cada 1mL de sangue. As amostras foram incubadas por 15 minutos, em temperatura ambiente, ao abrigo da luz, em agitação suave, para a lise das hemácias. Após centrifugação a 600g, por 10 minutos, a 4°C, o sobrenadante foi descartado e as células lavadas duas vezes com tampão fosfato-salina (PBS), por meio de centrifugação. As células foram ressuspensas em PBS e distribuídas em poços de placas de 96 poços de fundo em “U”, para imunomarcagem. Em cada poço foram adicionadas células em quantidade proporcional ao volume de 400 µL de sangue.

Dois grupos experimentais foram obtidos: células estimuladas ou não com *Pg*. Em cada grupo foi avaliado o efeito do Ale na expressão dos marcadores, obtendo-se assim quatro condições experimentais: Controle (RPMI); Ale (Alendronato de sódio a 1%); *Pg* (*P. gingivalis*); Ale + *Pg* (Alendronato de sódio + *P. gingivalis*).

5.5 Análise da viabilidade celular

A viabilidade celular foi avaliada utilizando-se marcação com Live/Dead. As células foram incubadas por 30 minutos, a 4°C, com Live/Dead (bv421) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) e anticorpos anti-CD14 (FITC, clone M5E2, BioLegend) e anti-CD66b (PE, clone G10F5, BioLegend) para identificação fenotípica de monócitos e granulócitos, respectivamente. Em seguida, as células foram lavadas com PBS 0,5% soro fetal bovino (SFB), fixadas com formaldeído 2% em PBS, por 15 minutos, a temperatura ambiente, e lavadas novamente com PBS. As células foram mantidas a 4°C, até aquisição de 100.000 eventos por tubo no citômetro de fluxo FACSCanto II (Becton Dickinson, New Jersey, USA).

5.6 Avaliação da produção de espécies reativas do oxigênio

Para avaliação da produção de espécies reativas do oxigênio, especialmente peróxido de hidrogênio, as células foram incubadas, por 30 minutos, a 4°C, com anticorpo anti-CD14 (FITC, clone M5E2, BioLegend), anticorpo anti-CD66b (PE, clone G10F5, BioLegend), dihidrorodamina 123 (DHR123) (Life Technologies, Molecular Probes, Oregon, USA) e Live/Dead (bv421) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Em seguida, foram lavadas com PBS 0,5% soro fetal bovino (SFB), fixadas com formaldeído 2% em PBS, por 15 minutos, a temperatura ambiente, lavadas com PBS e mantidas a 4°C, até aquisição de 100.000 eventos por tubo no citômetro de fluxo FACSCanto II (Becton Dickinson, New Jersey, USA).

5.7 Reações de imunofluorescência para marcação de TLR e citocinas

As células foram incubadas com Live/Dead (bv421) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) e anticorpos anti-CD14 (FITC ou APC, clone M5E2, BioLegend), anti-CD66b (PE, clone G10F5, BioLegend), anti-TLR2 (FITC, clone TL2.1, BioLegend) e anti-TLR4 (APC, clone HTA125, BioLegend), durante 30 minutos, a 4°C. Em seguida, foram lavadas com PBS 0,5% soro fetal bovino (SFB), fixadas com formaldeído 2% em PBS, por 15 minutos, a temperatura ambiente, e lavadas novamente com PBS. Após fixação, as células foram permeabilizadas com saponina 0,5% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), durante 15 minutos a temperatura ambiente, para marcação intracitoplasmática. Foram adicionados anticorpos monoclonais anti-IL-1 β (ALEXA FLUOR 647, clone JK1B-1, BioLegend), IL-8 (PerCP-Cy5, clone BH0814, BioLegend), IL-10 (PE/Cy7, Clone JES3-19F1, BioLegend), TNF

(PE/Cy7, clone MAb11, Biolegend) e LAP (TGF- β 1) (PE/Cy7, clone TW4-2F8, BioLegend) e as células mantidas por 30 minutos à temperatura ambiente. Após lavagem com saponina 0,5% e PBS, as células foram analisadas em citômetro de fluxo FACSCanto II (Becton Dickinson, New Jersey, USA), com aquisição de 100.000 eventos por tubo. Foram adicionados aos experimentos células não marcadas e controles de isotipo conjugados aos fluorocromos FITC, PE, PE/Cy7, APC, ALEXA FLUOR 647 e PerCP-Cy5.

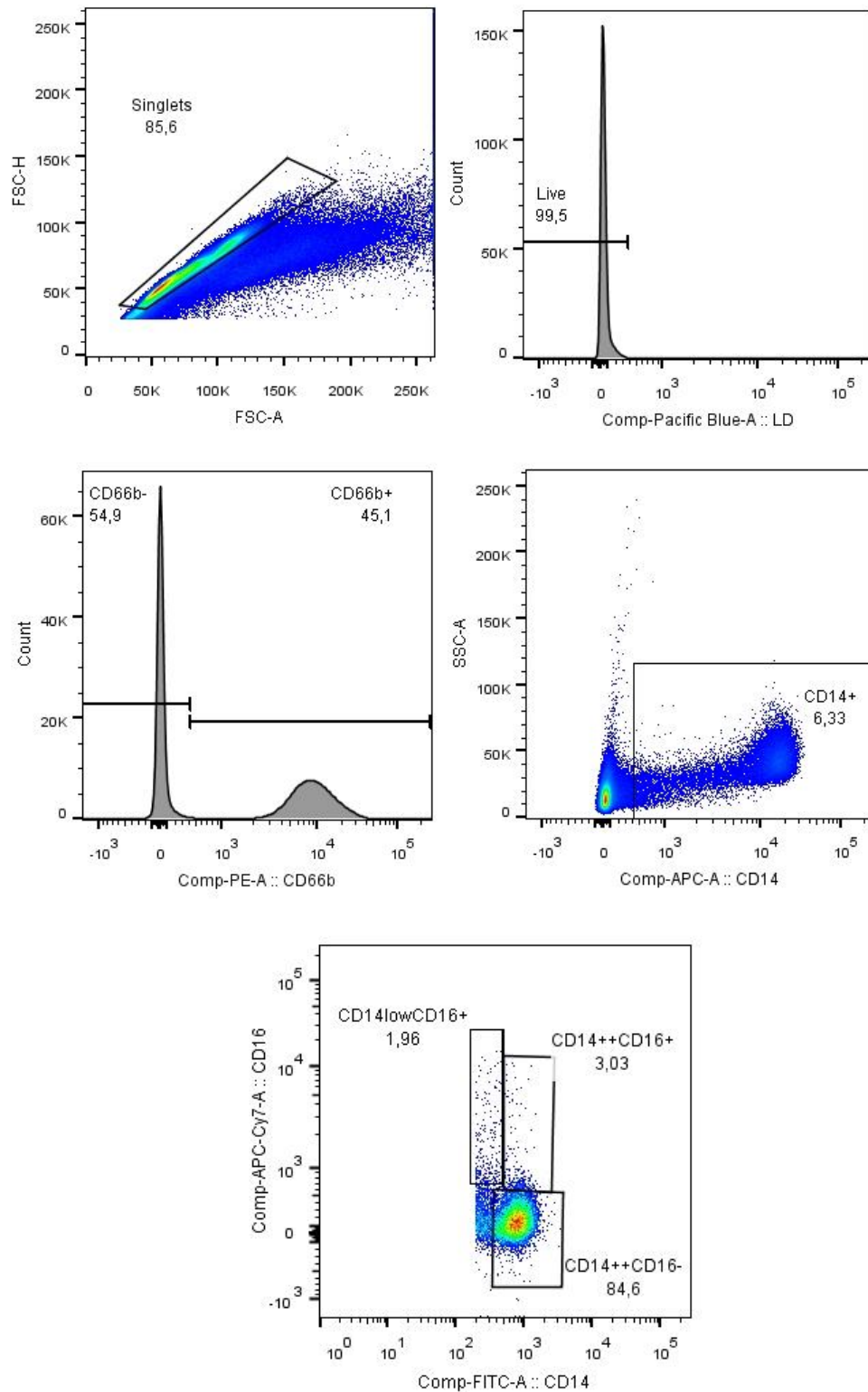
5.8 Citometria de fluxo

O software FlowJo X (Tree Star Inc., USA) foi utilizado para análises por citometria de fluxo. Inicialmente foram selecionadas as células viáveis pela marcação Live/Dead e, em seguida, selecionadas as células CD66b positivas (granulócitos) e negativas. Dentro da população CD66b negativa, foi selecionada a população CD14⁺ (monócitos). Para analisar as diferentes subpopulações de monócitos CD14⁺, com base no gráfico CD14 *versus* CD16, foram selecionadas as subpopulações de monócitos clássicos (CD14⁺⁺CD16⁻), intermediários (CD14⁺⁺CD16⁺) e não clássicos (CD14^{low}CD16⁺) (Fig. 1). As análises da expressão dos marcadores foram realizadas nas populações de granulócitos (CD66b⁺), de monócitos totais (CD14⁺) e nas subpopulações de monócitos fenotipicamente identificadas. Foram quantificadas as percentagens de células positivas e determinadas as medianas de intensidade de fluorescência (MIF) para DHR123, TLR2, TLR4, IL-1 β , IL-8, TNF, IL-10 e TGF- β 1. Na população de granulócitos, foi avaliada ainda a MIF para CD66b. Para análise da viabilidade celular de granulócitos e monócitos, inicialmente foram selecionadas as populações CD66b⁺ e CD14⁺ e dentro de cada uma dessas populações foram quantificadas as percentagens de células marcadas para Live/Dead.

5.9 Análises estatísticas

O teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para verificar a distribuição dos dados em cada grupo experimental. Para verificar existência de diferenças na expressão dos marcadores entre o grupo controle e o grupo estimulado com Pg e entre os grupos tratados ou não com Ale foram utilizados os testes Wilcoxon ou t de Student pareado, com nível de significância de 5%. As análises foram realizadas utilizando-se o software GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, EUA).

Figura 1: Gráficos de plotagem de pontos representativos mostrando a estratégia de análise e a seleção da população de granulócitos (CD66b⁺), de monócitos totais (CD14⁺), e das subpopulações de monócitos, fenotipicamente identificadas



Fonte: Elaborado pelo autor

6 ARTIGOS

6.1 Artigo Científico 1

Com o objetivo de avaliar o efeito de concentrações de uso tópico de alendronato de sódio na atividade de granulócitos humanos estimulados com *P. gingivalis*, foram realizadas incubações com sangue total de doadores saudáveis, imunomarcção de moléculas envolvidas nas respostas imunoinflamatórias e análise por citometria de fluxo. Os resultados foram compilados na forma de artigo científico intitulado **“Sodium alendronate affects the expression of TLRs and cytokines by human granulocytes stimulated with *Porphyromonas gingivalis*”**, que será submetido à análise no periódico **Journal of Applied Oral Sciences (Qualis A2)**.

As normas para submissão de artigos podem ser visualizadas no endereço eletrônico:
<https://www.scielo.br/journal/jaos/about/#instructions>

Sodium alendronate affects the expression of TLRs and cytokines by human granulocytes stimulated with *Porphyromonas gingivalis*

Hércules Henrique Onibene CASTRO^a, Carolina Cattoni KOH^b, Walderez Ornelas DUTRA^{bc}, Natália Rocha GUIMARÃES^c, Paula Prazeres MAGALHÃES^c, Luiz de Macêdo FARIAS^c, Martinho Campolina Rebello HORTA^a, Paulo Eduardo Alencar SOUZA^a.

^a Graduate Program in Dentistry, Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil

^b Departamento de Morfologia, ICB, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

^c Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Doenças Tropicais – INCT-DT, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

^d Departamento de Microbiologia, ICB, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil.

Corresponding Author:

Dr. Paulo Eduardo Alencar de Souza

Departamento de Odontologia - Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais.

Av. Dom José Gaspar, 500, Prédio 46, Sala 101 - Coração Eucarístico.

CEP 30535-901 - Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil

Telefone: +55 31 3319-4414 - E-mail: pauloalencar@pucminas.br.

ABSTRACT

Introduction: Alendronate sodium (Ale) is a bisphosphonate widely used systemically in the treatment of osteoporosis. Due to its bone resorption inhibition property, recent clinical studies have shown satisfactory results from the topical use of Ale in the form of a 1% gel, as an adjuvant in the treatment of periodontal disease. In addition to osteoclasts, phagocytes can also be affected by bisphosphonates. **Objectives:** to evaluate the effect of 1% Ale on cell viability and expression of molecules involved in immunoinflammatory responses by human granulocytes, stimulated in vitro with *Porphyromonas gingivalis* (Pg). **Material and Methods:** peripheral blood from 10 healthy donors was incubated with 1% (0.03M) Ale for 2 hours. Then, Pg was added and the samples incubated for another 6 hours. After lysis of the red blood cells, immunofluorescence and flow cytometry reactions were performed. The expressions of CD66b, TLR2, TLR4, DHR123, IL-1 β , IL-8, IL-10 e TNF by granulocytes phenotypically identified by the CD66b molecule were analyzed. **Results:** analysis by flow cytometry showed that Ale reduced the expression of CD66b, DHR123, TLR4, IL-8 and TNF in granulocytes not stimulated with bacteria. Considering cells stimulated with Pg, Ale reduced the median fluorescence intensity (MFI) of CD66b, TLR2, TLR4, IL-1 β and IL-8, although it increased the MFI of DHR 123 and the frequencies of positive cells for TLR2, TNF and IL-10 on granulocytes. **Conclusions:** The data suggest that the concentration of topical periodontal use of Ale was able to affect the expression of molecules involved in immunoinflammatory responses by Pg-activated or non-Pg activated granulocytes, which may contribute to the reduction of inflammation at periodontal sites.

Keywords: Alendronate sodium. Granulocytes. *Toll-like receptor*. Cytokines. *Porphyromonas gingivalis*.

INTRODUCTION

Bisphosphonates (BF) are one of the main drugs in therapies for diseases that affect bone metabolism, such as osteoporosis, in malignant tumors and intraosseous metastases.¹ When administered, BFs are deposited in the bone matrix through interaction with calcium crystals hydroxyapatite. The main pharmacological activity of BPs is the inhibition of bone resorption by osteoclasts, as they initiate bone matrix resorption, releasing the drugs deposited in it.¹

Periodontal disease is an inflammatory process that can affect the gingiva, periodontal ligament and alveolar bone. It is mainly caused by the accumulation of bacterial dysbiotic biofilm, which induces an immunoinflammatory response with the release of several Chemical mediators involved in the processes of bone resorption and degradation of the extracellular matrix, causing damage that is often irreversible, such as loss of attachment. Among the bacterial species most found in periodontal disease are *Porphyromonas gingivalis* (Pg) and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, responsible for the worsening of periodontal disease.²

The control of immunoinflammatory responses in periodontal tissues involves the secretion of cytokines, the expression of cell surface costimulatory molecules and the production of enzymes related to microbicidal activity by immunocompetent cells. The differential expression of these molecules determines the course of the inflammatory process, stimulating the fight against microorganisms and inducing the activation of tissue destruction mechanisms.³

Due to the bone resorption inhibition property, recent studies have investigated the potential of BPs in the treatment of periodontal disease. In clinical studies, the topical use of alendronate sodium (Ale) in the form of a 1% gel, as an adjunct in non-surgical periodontal treatment, has shown a reduction in bleeding on probing, clinical attachment level and probing depth.⁴⁻⁸

The topical use of BPs as a complementary therapy in the treatment of periodontal and peri-implant diseases, although in concentrations much higher than those found in blood plasma when administered systemically, seems promising and with fewer undesirable effects. This is because, as they are not systemically bioavailable, osteonecrosis of the jaws is avoided.^{4,9,10}

Although the effects of BPs on osteoclasts activity have been extensively studied, little is known about their effects on immunocompetent cells, especially when stimulated by products of the periodontal microbiota. Considering the role of these cells in combating periodontal microorganisms and their products, it becomes relevant to evaluate the effects of

alendronate sodium on the activity of human granulocytes stimulated with periodontopathogens.

MATERIAL AND METHODS

Alendronate sodium

In this study sodium alendronate (Rini Life Science Pvt.Ltd, India) (Ale) was used at a final concentration of 1% (0.03M) in cell cultures. Ale was dissolved in Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640) (Sigma Aldrich) medium, moments before use.

Bacteria preparation

Sample of *Porphyromonas gingivalis* (Pg) (ATCC® 33277™, Manassas, VA, USA) was cultured in *Brain Heart Infusion Agar* (BHI - Difco, Sparks, MD, USA), supplemented with 0.1% porcine hemin (Inlab Confiança, Diadema, SP, Brazil), 0.5% yeast extract (Difco, Sparks, MD, USA) and 0.1% de menadione (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), and enriched with 5% sheep blood (BHIA-S/E), pH 7.2. The bacteria were incubated for 5 days in an anaerobic chamber (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) with na atmosphere of 85% N₂, 5% CO₂ and 10% H₂, at 37°C. The colonies were transferred to tubes containing saline solution, homogenized and adjusted to an OD_{600nm} of 0,9 in a spectrophotometer (Micronal, S. A., SP, Brazil). The bacteria were then washed with PBS and inactivated by heating at 100°C for 30 minutes. The samples were kept at -80°C for use in the experiments.

Blood samples

Approximately 20ml of blood were collected from ten healthy voluntary donos through peripheral vein puncture, using tubes containing heparin (Becton Dickinson Vacutainer®, USA). Exclusion criteria were individuals with immunosuppression, periodontal disease, systemic infectious disease, smokers, chronic alcoholics, autoimmune disease, chronic inflammatory diseases or who were undergoing treatment with chemotherapy, antineoplastic, antibiotic, immunosuppressive or anti-inflammatory drugs in the last 30 days. All volunteers were clinically examined to verify the absence of periodontal disease. This work was approved by the Research Ethics Committee at the Pontifical Catholic University of Minas Gerais (CAAE: 61550216.0.0000.5137) and conducted in accordance with current regulations.

Treatment with alendronate sodium and stimulation with *P. gingivalis*

Based on the concentration of alendronate sodium used clinically in periodontal treatment, a final concentration of 1% (0.03M) was defined in short-term cultures. Previous experiments performed by our research group showed that this concentration does not

significantly affect the cell viability of human granulocytes. Samples of 1 ml of blood from each donor were transferred to polypropylene tubes and then Ale was added at a final concentration of 0.03M. The samples were kept in an oven at 37°C, 5% CO₂, for 2 hours. Then, heat inactivated Pg was added at a final concentration of 5x10⁵ UFC/ml and the samples were incubated for another 6 hours in a CO₂ oven. Four hours before the end of incubation, in all experimental groups, Brefeldin A (1 µg/ml) (eBioscience, San Diego, CA, USA), was added to the tubes intended for cytokine immunostaining.

At the end of the treatments, the blood samples were transferred to 50 ml conical tubes and 20 ml of lysis solution (8,26g/L NH₄Cl; 1g/L KHCO₃; 37,2 mg/L Na₂EDTA), were added for each 1 ml of blood. The samples were incubated for 15 minutes at room temperature, protected from light, with gentle agitation, for the lysis of red blood cells. After centrifugation at 600g for 10 minutes at 4°C, the supernatant was discarded, and the cells washed twice with phosphate-buffered saline (PBS) by means of centrifugation. Cells were resuspended in PBS and distributed into wells of 96-well-U-bottom plates for immunostaining. Cells were added to each well in proportion to the volume of 400 µL of blood.

Two experimental groups were obtained: cells stimulated or not with Pg. In each group, the effect of Ale on the expression of the markers was evaluated, thus obtaining four experimental conditions: Control (RPMI); Ale (Sodium Alendronate); Pg (*P. gingivalis*); Ale+ Pg (Sodium Alendronate + *P. gingivalis*).

Cell viability analysis

Cell viability was assessed using Live/Dead labeling. Cells were incubated for 30 minutes at 4°C with Live/Dead (bv421) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and anti-CD66b (PE, clone G10F5, BioLegend) for phenotypic identification of granulocytes. Then, the cells were washed with PBS 0.5% fetal bovine serum (FBS), fixed with 2% formaldehyde in PBS for 15 minutes at room temperature, and washed again with PBS. Cells were kept at 4°C until acquisition of 100.000 events per tube on the FACSCanto II flow cytometer (Becton Dickinson, New Jersey, USA).

Evaluation of the production of reactive oxygen species

To evaluate the production of reactive oxygen species, especially hydrogen peroxide, cells were incubated for 30 minutes at 4°C with anti-CD66b antibody (PE, clone G10F5, BioLegend), dihydrorodamine 123 (DHR123) (Life Technologies, Molecular Probes, Oregon, USA) and Live/Dead (bv421) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Then, they were washed with PBS 0.5% fetal bovine serum (FBS), fixed with 2% formaldehyde in PBS for 15 minutes at room temperature, washed with PBS and kept at 4°C, until the acquisition of

100.000 events per tube in the FACSCANTO II flow cytometer (Becton Dickinson, New Jersey, USA).

Immunofluorescence reactions for TLR and cytokine labeling

Cells were incubated with Live/Dead (bv421) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and anti-CD66b (PE, clone G10F5, BioLegend), anti-TLR2 (FITC, clone TL2.1, BioLegend) and anti-TLR4 (APC, clone HTA125, BioLegend), for 30 minutes at 4°C. Then, they were washed with PBS 0.5 % fetal bovine serum (FBS), fixed with 2% formaldehyde in PBS for 15 minutes at room temperature, and washed again with PBS. After fixation, cells were permeabilized with 0.5% saponin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), for 15 minutes at room temperature for intracytoplasmic labeling. Were added Anti-IL-1 β monoclonais (ALEXA FLUOR 647, clone JK1B-1, BioLegend), IL-8 (PerCP-Cy5, clone BH0814, BioLegend), IL-10 (PE/Cy7, Clone JES3-19F1, BioLegend), TNF (PE/Cy7, clone MAb11, Biolegend), and the cells kept for 30 minutes at room temperature. After washing with 0.5% saponin and PBS, the cells were made in a FACSCanto II cytometer (Becton Dickinson, New Jersey, USA), with acquisition of 100.000 events per tube. Unlabeled cells and isotype controls conjugated to the fluorochromes FITC, PE, PE/Cy7, APC, ALEXA FLUOR 647 and PerCP-Cy5 were added to the experiments.

Flow cytometry

FlowJo x software (Tree Star Inc., USA) was used for flow cytometric analysis. Initially, viable cells were selected by Live/Dead staining, and then CD66b positive cells (granulocytes) were selected. Marker expression analyzes were performed on granulocyte populations (CD66b+). The percentages of positive cells were quantified and the median fluorescence intensity (MIF) for DHR123, TLR2, TLR4, IL-1 β , IL-8, TNF and IL-10 were determined. In the granulocyte population, MIF for CD66b was also evaluated. To analyze the cell viability of granulocytes, CD66b+ populations were initially selected and within each of these populations the percentages of cells marked for Live/Dead were quantified.

Statistical analysis

The Kolmogorov-Smirnov normality test was used to verify the distribution of data in each experimental group. To verify the existence of differences in the expression of markers between the control group and the group stimulated with Pg and between the groups treated or not with Ale, the Wilcoxon or paired Student's tests were used, with a significance level of 5%. Analyzes were performed using GraphPad Prism 5.01 software (GraphPad Software, San Diego, California, USA).

RESULTS

Analysis of granulocyte cell viability in different treatments

Cell viability analysis by Live/Dead labeling showed that 1% Ale was not able to significantly affect the viability of human granulocytes (Fig. 2). Stimulation with Pg significantly reduced the viability of CD66b⁺ granulocytes, although the frequencies of viable cells after stimulation with Pg still remained high ($92.3 \pm 3,7\%$) (Fig. 2). Prior exposure of these cells to Ale reversed this reduction in cell viability (Fig. 2).

Ale effect on CD66b expression and production of reactive oxygen species by granulocytes

Analysis of CD66b expression showed that Ale significantly reduced the MIF of this molecule in the granulocyte population (Fig. 3A). Pg stimulation significantly increased CD66b MIF over the control group (Fig. 3A). However, prior exposure to Ale significantly reduced CD66b MIF in Pg-stimulated granulocytes, reversing the effect of bacteria (Fig. 3A).

Analysis of the expression of dihydrorhodamine 123 (DHR123), a marker of production of reactive oxygen species, especially hydrogen peroxide, revealed that exposure to Ale reduced the MIF of DHR213 in CD66b⁺ granulocytes (Fig. 3C). Stimulation with Pg increased the frequency of DHR123⁺ cells, but reduced the MIF of this molecule in granulocytes (Fig. 3B and C). Ale exposure significantly reduced the frequency of DHR123⁺ cells in the Pg-stimulated granulocyte population, but increased the MIF of this molecule (Fig. 3B and C).

Ale effect on TLR2 and TLR4 expression by granulocytes

Ale treatment did not significantly affect TLR2 expression on CD66b⁺ granulocytes (Fig. 3D and E), but significantly reduced the frequencies of positive cells and TLR4 MIF in this cell population (Fig. 3F and G). Pg stimulation reduced the frequency of TLR2⁺ cells (Fig. 3D), but increased the TLR2 MIF and the frequency of TLR4⁺ Cells in the CD66b⁺ granulocyte population (Fig. 3E and F). Considering Pg-stimulated cells, Ale treatment increased the frequency of TLR2⁺ cells, although it reduced TLR2 and TLR4 MIF in granulocytes (Fig. 3D, E and G).

O tratamento com Ale não afetou significativamente a expressão de TLR2 nos granulócitos CD66b⁺ (Fig. 3D e E), mas reduziu significativamente as frequências de células positivas e a MIF de TLR4 nessa população celular (Fig. 3F e G). Estimulação com Pg reduziu a frequência de células TLR2⁺ (Fig. 3D), mas aumentou a MIF de TLR2 e a frequência de células TLR4⁺ na população de granulócitos CD66b⁺ (Fig. 3E e F). Considerando as células estimuladas com Pg, o tratamento com Ale aumentou a frequência de células TLR2⁺, embora tenha reduzido a MIF de TLR2 e de TLR4 nos granulócitos (Fig. 3D, E e G).

Ale effect on cytokine expression by granulocytes

Analysis of cytokine production showed that Ale exposure significantly reduced IL-8 and TNF MIF (Fig. 4D and F) in the CD66b+ granulocyte population.

Stimulation with Pg significantly increased the frequencies of positive cells and the MIF of IL-1 β and IL-8 (Fig; 4A, B, C and D), but reduced the MIF of TNF (Fig. 4F) in the granulocyte population. Considering the cells stimulated with Pg, exposure to Ale reduced the frequencies of positive cells and MIF of IL-1 β and IL-8 (Fig. 4A, B, C and D), reversing the effects of the bacteria on the expression of these cytokine in the population of CD66b+ granulocytes. On the other hand, Ale exposure in the Pg-stimulated group increased the frequencies of TNF+ and IL-10+ cells (Fig. 4E and G).

DISCUSSION

Topical application of alendronate sodium gel at 1% as an adjuvant in periodontal treatment has shown satisfactory clinical results regarding bleeding on probing, loss of clinical attachment and probing depth.^{7,11} Studies have already shown that bisphosphonates are endocytosed by phagocytic cells, which may affect the activity of these cells. No studies were found in the literature evaluating the effect of alendronate on the activity of granulocytes stimulated with periodontopathogens. In the present study, the effect of 1% sodium alendronate (Ale) on the expression of molecules involved in periodontal immunoinflammatory processes by CD66b positive granulocytes was evaluated. This cell population evaluated comprises neutrophils and eosinophils, although neutrophils represent the majority of these cells. Cytometric analyzes showed that Ale was not able to significantly affect granulocyte viability in short-term cultures.

In order to evaluate the effect of Ale on human leukocytes stimulated with periodontopathogenic bacteria, a condition that occurs in periodontal tissues during periodontitis, in present study we stimulated cells in vitro with *P. gingivalis*. Pg is a Gram-negative periodontopathogenic bacterium, whose LPS can be recognized by several cells, including granulocytes, inducing the expression and release of various inflammatory mediators involved in immune defense mechanisms.¹²⁻¹⁵ These mediators are important for the development of periodontitis and the presence of Pg is directly related to tissue damage.^{16,17}

In the present study, stimulation of cells with Pg reduced the viability of granulocytes, while previous exposure of these cells to Ale reversed this reduction in viability. The molecular mechanisms by which Ale directly or indirectly interferes with the activity and survival of bacterial stimulated granulocytes are not yet known.

Neutrophils exert their antimicrobial functions through phagocytosis and production of lytic enzymes and reactive oxygen species (ROS), which are responsible for the death of the

microorganism. In addition to their direct oxidative attack, oxygen radicals can modulate several cellular activities that are important mediators in the sequence of events that cause tissue damage.¹⁸

The detection of respiratory burst products by neutrophils can be performed by means of incubation with dihydrorhodamine 123 (DHR123), a substrate that is oxidized by hydrogen peroxide, generating fluorescent rhodamine.¹⁹ Analysis of the expression of DHR123 revealed that Ale reduced the MIF of DHR123 in granulocytes not stimulated with bacteria. Stimulation with Pg increased the frequencies of DHR123+ granulocytes, but reduced the MIF of these molecules compared to the control. It is possible that the kinetics of ROS expression are involved in these results, with initial stimulation of the respiratory burst and an increase in the frequency of producing granulocytes, followed by a reduction in the amount of hydrogen peroxide by activated cells over the six hours of incubation. Treatment with Ale reversed these effects of the bacteria. The production of ROS in response to bacteria is an important mechanism to fight infection.²⁰ Although Ale reduced the frequencies of DHR123+ granulocytes, the MIF of this molecules was significantly increased by the drug. Studies evaluating the microbial activity of granulocytes exposed to Ale are necessary to determine the real effect of bisphosphonate in this process.

Flow cytometric analysis also showed that exposure to Pg stimulated the production on the pro-inflammatory cytokines IL-1 β and IL-8 and reduced TNF MIF in granulocytes. An in vitro study showed that stimulation with Pg induced a significant increase in the production of ROS and IL-8 by neutrophils.¹⁷ Another study showed that stimulation of circulating neutrophils from patients with aggressive periodontitis with Pg LPS significantly increased neutrophil responses and the production of ROS.²¹ This data partially corroborates the results of the present study, regarding the stimulation of the expression of the pro-inflammatory cytokines IL-1 β and IL-8. However, inhibition of TNF expression. By Pg was observed, which may reflect an initial kinetics of production of this cytokine with a reduction after cell stimulation.

The CD66b molecule, expressed on the surface of granulocytes, plays a role in cell adhesion, chemotaxis and binding to microbial products, and the intensity of its expression is related to the level of neutrophil activation.²² In the present study, stimulation with Pg significantly increased the expression of CD66b on granulocytes. Prior exposure to Ale reduced CD66b on granulocytes. Prior exposure to Ale reduced CD66b MIF in both Pg-stimulated and non-stimulated granulocytes, reversing the bacterial effect on cells. These results suggest that, although Ale does not affect cell viability, neutrophil activity can be inhibited by bisphosphonate exposure, even in environments of microbial infection.

Previous studies have shown that TLR2 and TLR4 are extremely important receptors for the progression of inflammation and control of bone metabolism in periodontitis.²³⁻²⁵ TLR4 is the receptor for LPS from gram-negative bacteria.²⁶ LPS from *P. gingivalis* can bind to TLR4

of immunocompetent cells and induce other cells such as gingival fibroblasts to produce IL-1, IL-6 and IL-8.²⁷⁻²⁸ The absence of TLR4 reduces phagocytic activity against the bacteria *Neisseria Meningitidis*, *Streptococcus agalactiae* and *Yersenia pestis*, demonstrating the role of this receptor in the microbicidal activity of phagocytes.²⁹ It has been demonstrated in the literature that TLR2 and TLR4 play distinct roles in the expression of IL-1 β , TNF- α and IL-10 induced by *P.gingivalis* in experimental periodontitis by ligation.²⁵ Another study also showed that LPS from *P.gingivalis* stimulates leukocytes preferentially by binding to TLR2, inducing increased secretion of pro-inflammatory cytokines.^{25,30} In the present study, Ale reduced the expression of TLR4 in granulocytes stimulated and not stimulated with Pg. TLR2 expression was not significantly affected by Ale in granulocytes not stimulated with bacteria. Although Pg reduced the frequencies of TLR2+ granulocytes and increased the MIF of this receptor, previous exposure of these cells to Ale reversed the effects of the bacteria. The reduction in the frequency of TLR2+ cells when stimulated with Pg may be due to a negative feedback mechanism after bacterial stimulation. The reversal of the Pg effect by Ale may represent a mechanism of inhibition of the TLR2 activation pathway, contributing to the reduction of periodontal inflammatory stimuli and consequent reduction of tissue damage. However, the activation of neutrophils is important in combating periodontopathogenic bacteria. As for TLR4, although it is not the main cell receptor for stimulating the secretion of inflammatory mediators by LPS from *P. gingivalis*³⁰, its activation potentiates the stimulatory action of TLR2 in macrophages during response to this bacterial species.³¹ In addition, it has been demonstrated in ligation induced periodontitis model in mice that *P.gingivalis* induced periodontal bone loss is TLR4 dependent.²⁵ Thus, inhibition of TLR4 expression by Ale, both in Pg-stimulated and non-stimulated granulocytes, may contribute to lower stimulation of these cells in periodontal tissues and possibly lower alveolar bone resorption.

Several studies have shown the role of cytokines in controlling immunoinflammatory responses in periodontitis, regulating both the fight against microorganisms and the tissue destruction mechanism.^{32,33} In the present study, stimulation with Pg increased the expression of IL-1 β and IL-8 cytokines, but reduced the MIF of TNF by granulocytes. IL-8 is a pro-inflammatory cytokine secreted by several cells, including neutrophils, that acts in periodontal disease. It has chemotactic activity for neutrophils, being able to activate these cells and also stimulate bone resorption.³³ IL-1 β plays an important role in the innate immune response, regulating granulocyte diapedesis and stimulating the synthesis of prostaglandin (PGE2) and matrix metalloproteinase (MMP) by fibroblasts, which are involved in the destruction of the extracellular matrix of connective tissue, fibrous tissue and alveolar bone.³⁴ TNF is one of the most important cytokines in the inflammatory process in periodontitis, stimulating bone resorption and activation of several cells.³⁵ It induces the expression of adhesion molecules

on the endothelial surface, stimulating leukocyte diapedesis and contributing to for the establishment of tissue inflammatory infiltrate.³⁶

Flow cytometric analysis showed that Ale reduced the MIF of IL-8 and TNF in granulocytes not stimulated with Pg, suggesting an anti-inflammatory and neutrophil response inhibition effect. Considering the cells stimulated with Pg, Ale reduced the expression of IL-1 β and IL-8 but increased the percentage of TNF and IL-10 positive cells. The reversal of Pg stimulation in the production of IL-1 β and IL-8 cytokines by exposure to Ale may represent an anti-inflammatory effect of this drug on periodontal tissues, contributing to the inhibition of leukocyte recruitment and activation, especially neutrophils. However, in periodontal tissues there are other cellular sources of cytokines that should be investigated regarding their susceptibility to the inhibitory action of Ale, such as macrophages, fibroblasts and endothelial cells. Our data showed that the effect of Ale on granulocytes depends on the activation of these cells by Pg, since in cells not stimulated with bacteria there was a reduction in TNF MIF and in those stimulated with Pg there was an increase in the frequency of TNF+ cells. As observed for the cytokines IL-1 β and IL-8, Ale also reversed the effects of Pg on TNF expression by granulocytes. However, in this case, the effect of Pg was to reduce the MIF of TNF, while Ale increased the percentage of TNF+ cells. Interestingly, Ale also increased the percentage of IL-10 producing cells in the group stimulated with Pg, while stimulation with Pg showed a tendency to reduce the frequency of IL-10+ cells, but without a statistically significant difference. IL-10 exerts an anti-inflammatory effect limiting immune responses and reducing tissue damage.³⁷ it inhibits the secretion of IL-1, IL-6, IL-8 and TNF- α cytokines and the expression of co-stimulatory and presenting molecules of antigens in different cell types.^{2,37,38} IL-10 also inhibits the activity of macrophages and T lymphocytes, the generation of free radicals, osteoclastogenesis and angiogenesis.³⁷ Analyzing all the effects observed in the expression of cytokines evaluated in granulocytes stimulated with Pg, our data show that Ale reverses the effects generated by the bacteria and can inhibit biological processes relevant to periodontitis, such as alveolar bone resorption. These data also suggest that the exposure of granulocytes to Ale, used topically in periodontal treatment, can interfere with the tissue inflammatory response and the processes of microbial combat and tissue destruction.

At periodontal sites, stimulation of immunocompetent cells involves the participation of several bacterial species with different virulence factors. Other cellular sources of cytokines contribute to tissue levels of these molecules and the kinetics of expression of these molecules can also vary after microbial stimulation. Although the limitations of the *in vitro* study must be considered, the results of this preliminary study point to an inhibitory effect on the expression of several molecules involved in the process of maintaining periodontal homeostasis in a healthy condition and in the etiopathogenesis of periodontitis. Clinical studies and experimental models are needed to confirm the impact of Ale effects on granulocytes under

the stimulus of periodontopathogens, especially regarding the microbicidal capacity and inhibition of tissue destruction processes that characterize periodontitis.

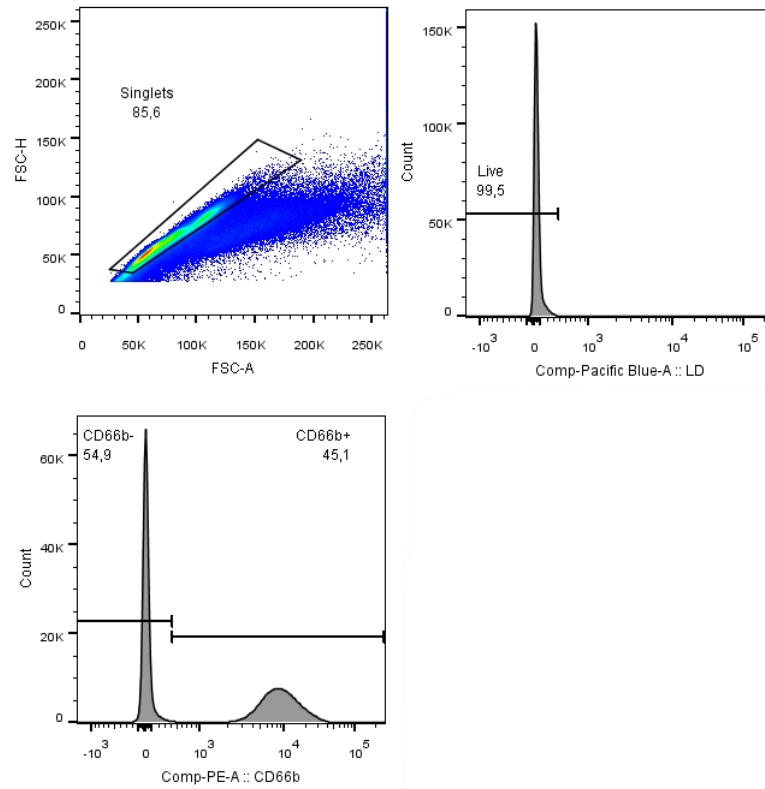


Figure 1 -

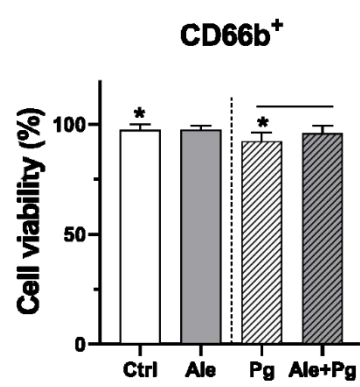


Figure 2 -

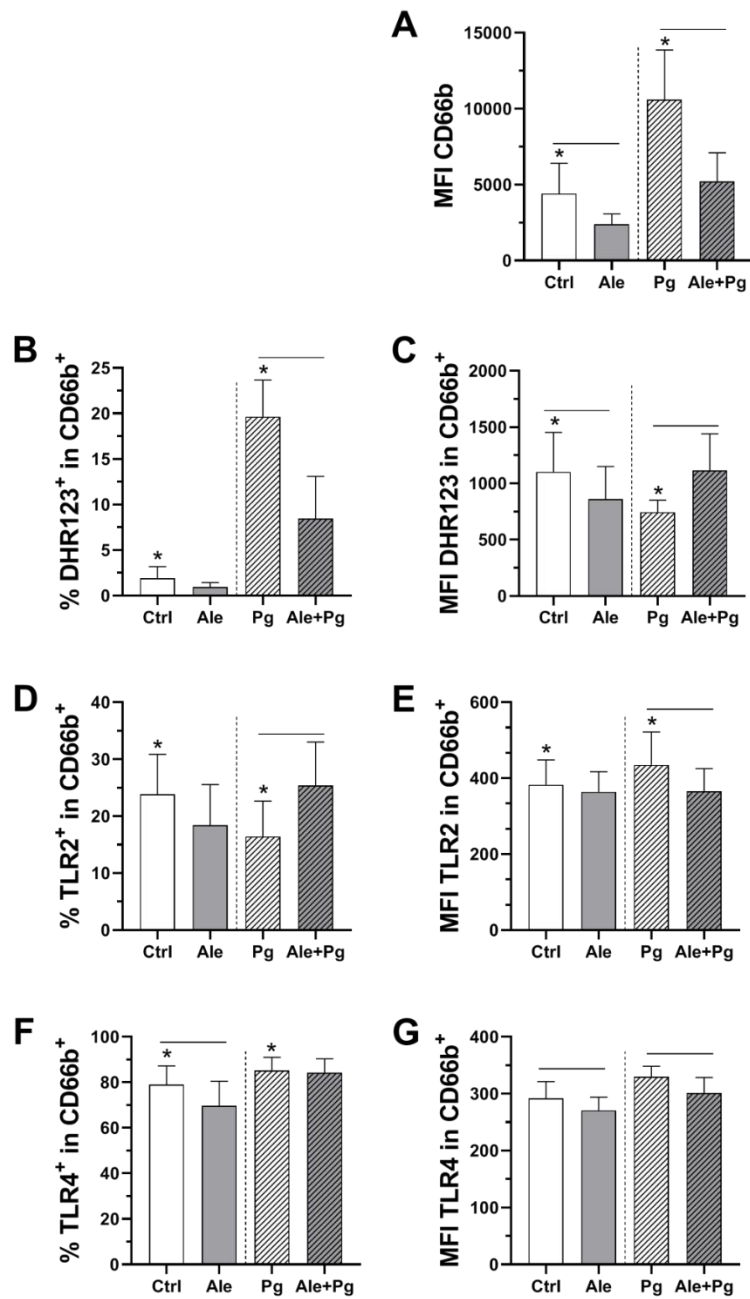


Figure 3 -

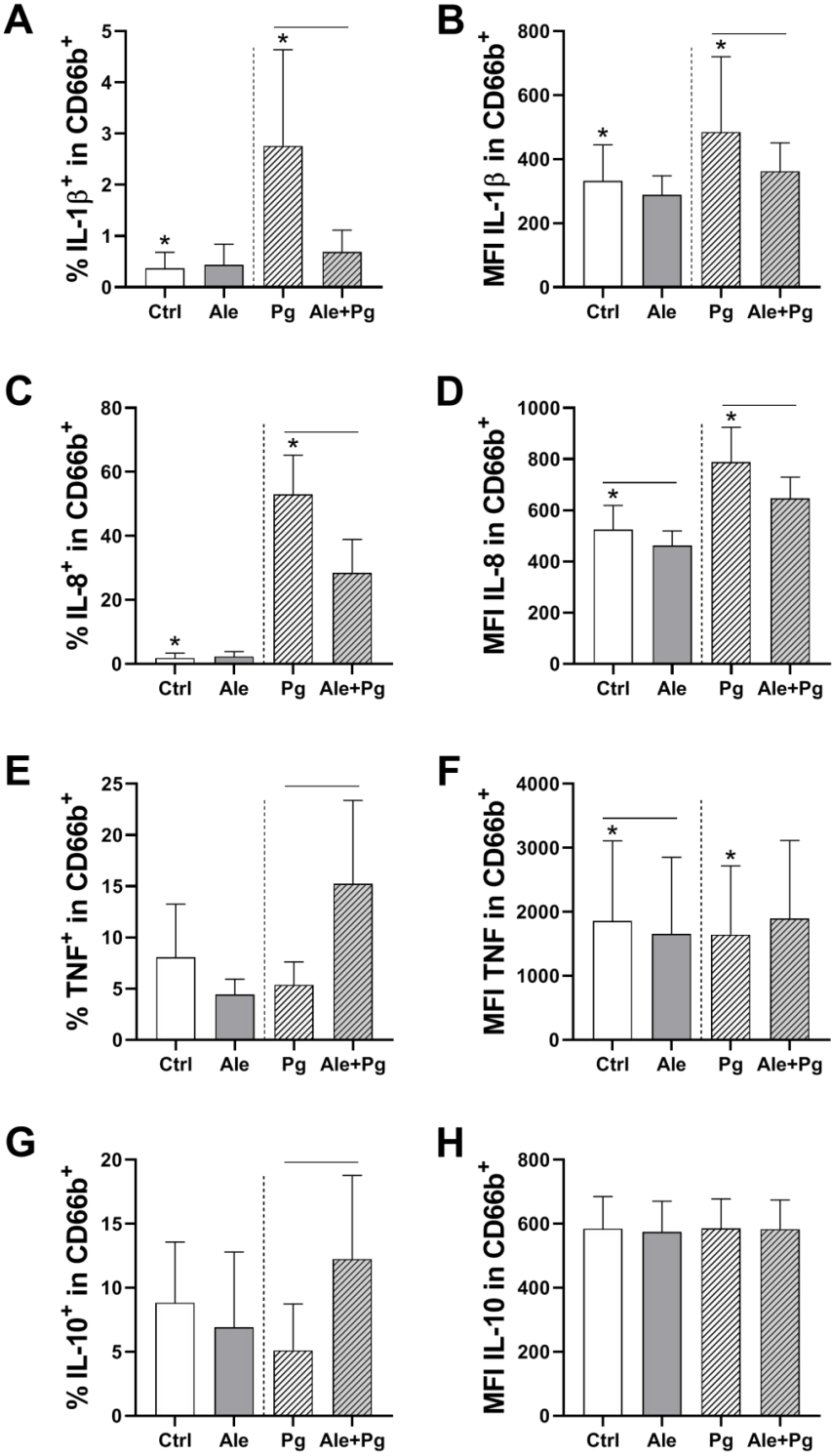


Figure 4 -

REFERENCES

1. Madrid C, Sanz M. What impact do systemically administrated bisphosphonates have on oral implant therapy? A systematic review. *Clin Oral Implants Res.* 2009;20(4):87-95. doi: 10.1111/j.1600-0501.2009.01772.x.
2. Ata-Ali J, Flichy-Fernández AJ, Alegre-Domingo T, Ata-Ali F, Palacio J, Peñarrocha-Diago M. Clinical, microbiological, and immunological aspects of healthy versus peri-implantitis tissue in full arch reconstruction patients: a prospective cross-sectional study. *BMC Oral Health.* 2015;15(43):1-10. doi: 10.1186/s12903-015-0031-9.
3. Tamal R, Sugiyama A, Kiyoura Y. Alendronate regulates cytokine production induced by lipid A through nuclear factor- κ B and Smad3 activation in human gingival fibroblasts. *J Periodontal Res.* 2011;46(1):13-20. doi: 10.1111/j.1600-0765.2010.01302.x.
4. Pradeep AR, Sharma A, Rao NS, Bajaj P, Naik SB, Kumari M. Local drug delivery of alendronate gel for the treatment of patients with chronic periodontitis with diabetes mellitus: a double-masked controlled clinical trial. *J Periodontol.* 2012;83(10):1322-8. doi: 10.1902/jop.2012.110292.
5. Sharma A, Pradeep AR. Clinical efficacy of 1% alendronate gel as a local drug delivery system in the treatment of chronic periodontitis: a randomized, controlled clinical trial. *J Periodontol.* 2012;83(1):11-18. doi: 10.1902/jop.2011.110091.
6. Sharma A, Pradeep AR. Clinical efficacy of 1% alendronate gel in adjunct to mechanotherapy in the treatment of aggressive periodontitis: a randomized controlled clinical trial. *J Periodontol.* 2012;83(1):19-26. doi: 10.1016/0003-9969(64)90024-x.
7. Pradeep AR, Kumari M, Rao NS, Naik SB. 1% alendronate gel as local drug delivery in the treatment of class furcation defects: a randomized controlled clinical trial. *J Periodontol.* 2013;84(3):307-15. doi: 10.1902/jop.2012.110729.
8. Dutra BC, Oliveira AMSD, Oliveira PAD, Manzi FR, Cortelli SC, Cota LOM, et al. Effect of 1% sodium alendronate in the non-surgical treatment of periodontal intraosseous defects: a 6-month clinical trial. *J Appl Oral Sci.* 2017;25(2): 310-317. doi: 10.1590/1678-7757-2016-0252.
9. Soileau KM. Oral post-surgical complications following the administration of bisphosphonates given for osteopenia related to malignancy. *J Periodontol.* 2006;77(1):738-43. doi: 10.1902/jop.2006.050187.
10. Wang HL, Weber D, Mccauley LK. Effect of long-term oral bisphosphonates on implant wound healing: Literature review and a case report. *J Periodontol.* 2007;78(1):548-94. doi: 10.1902/jop.2007.060239.
11. Kanoriya D, Pradeep AR, Singhal S, Garg V, Guruprasad CN. Synergistic approach using platelet-rich fibrin and 1% alendronate for intrabony defect treatment in chronic

- periodontitis: a randomized clinical trial. *J Periodontol.* 2016;87(12):1427-35. doi: 10.1902/jop.2016.150698.
12. Gibson FC 3rd, Yumoto H, Takahashi Y, Chou HH, Genco CA. Innate immune signaling and *Porphyromonas gingivalis*-accelerated atherosclerosis. *J Dental Res.* 2006;85(2):106-21. doi: 10.1177/154405910608500202.
 13. Behrens EM. Macrophage activation syndrome in rheumatic disease: what is the role of the antigen presenting cell? *Autoimmun Rev.* 2008;7(4):305-8. doi: 10.1016/j.autrev.2007.11.025.
 14. Agarwal S, Pisco NP, Johns LP, Riccelli AE. Differential expression of MARX IL- 1b, TNF- α , IL-6 and IL-8 in human monocytes in response to lipopolysaccharides from different microbes. *Dent Res.* 1995;74(4):1057-65. doi: 10.1177/00220345950740040501.
 15. Bainbridge BW, Darveau RP. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide: an unusual pattern recognition receptor ligand for the innate host defense system. *Acta Odontol Scand.* 2001;59(3):131-8. doi: 10.1080/000163501750266710.
 16. Sun Y, Shu R, Li CL, Zhang MZ. Gram-negative periodontal bacteria induce the activation of Toll-like receptors 2 and 4, and cytokine production in human periodontal ligament cells. *J Periodontol.* 2010;81(10):1488-96. doi: 10.1902/jop.2010.100004.
 17. Jayaprakash K, Demirel I, Khalaf H, Bengtsson T. The role of phagocytosis, oxidative burst and neutrophil extracellular traps in the interaction between neutrophils and the periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*. *Mol Oral Microbiol.* 2015;30(5):361-75. doi: 10.1111/omi.12099.
 18. Kantarci A, Oyaizu K, Van Dyke TE. Neutrophil-mediated tissue injury in periodontal disease pathogenesis: findings from localized aggressive periodontitis. *J Periodont.* 2003;74(1):66-75. doi: 10.1902/jop.2003.74.1.66.
 19. Richardson MP, Ayliffe MJ, Helbert M, Davies EG. A simple flow cytometry assay using dihydrorhodamine for the measurement of the neutrophil respiratory burst in whole blood: comparison with the quantitative nitrobluetetrazolium test. *J Immunol Methods.* 1998 Oct;219(1-2):187-93. doi: 10.1016/s0022-1759(98)00136-7.
 20. Emmendorffer A, Hecht M, Lohmann-Matthes ML, Roesler J. A fast and easy method to determine the production of reactive oxygen intermediates by human and murine phagocytes using dihydrorhodamine 123. *J Immunol Methods.* 1990;131(2):269-75. doi: 10.1016/0022-1759(90)90198-5.
 21. Shapira L, Warbington M, Van Dyke TE. TNF α and IL-1 β in serum of LJP patients with normal and defective neutrophil chemotaxis. *J Periodontal Res.* 1994;29(5):371-3. doi: 10.1111/j.1600-0765.1994.tb01236.x.
 22. Schmidt T, Zündorf J, Gröger T, Brandenburg K, Reiners AL, Zinserling J, et al. CD66b overexpression and homotypic aggregation of human peripheral blood neutrophils after

- activation by a gram-positive stimulus. *J Leukoc Biol.* 2012;91(5):791-802. doi: 10.1189/jlb.0911483.
23. Berdeli A, Emingil G, Han Saygan B, Gu'ulkan A, Atilla G, Ko'se T, et al. TLR2 Arg753Gly, TLR4 Asp299Gly and Thr399Ile gene polymorphisms are not associated with chronic periodontitis in a Turkish population. *J Clin Periodontol* 2007;34:551-7. doi: 10.1111/j.1600-051X.2007.01092.x.
 24. De Oliveira NFP, Andia DC, Planello AC, Pasett SO, Marques MR, Nociti Jr FH, et al. TLR2 and TLR4 gene promoter methylation status during chronic periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2011 Nov;38(11):975-83. doi: 10.1111/j.1600-051X.2011.01765.x.
 25. Lin M, Hu , Wang Y, Kawai T, Wang Z, Han X. Different engagement of TLR2 and TLR4 in *Porphyromonas gingivalis* vs. ligature-induced periodontal bone loss. *Braz Oral Res.* 2017;31(63):e63. doi: 10.1590/1807-3107BOR-2017.vol31.0063.
 26. Underhill DM, Ozinsky A. Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. *Curr Opin Immunol.* 2002;14(1):103-10. doi: 10.1016/s0952-7915(01)00304-1.
 27. Wang PL, Azuma Y, Shinohara M, Ohura K. Toll-like receptor 4-mediated signal pathway induced by *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide in human gingival fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;273(3):1161-7. doi: 10.1006/bbrc.2000.3060.
 28. Herath TDK, Darveau RP, Seneviratne CJ, Wang CY, Wang Y, Jin L. Tetra- and penta-acylated lipid A structures of *Porphyromonas gingivalis* LPS differentially activate TLR4-mediated NF- κ B signal transduction cascade and immuno-inflammatory response in human gingival fibroblasts. *PLoS One.* 2013;8(3):e58496. doi: 10.1371/journal.pone.0058496.
 29. Jain S, Darveau RP. Contribution of *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide to periodontitis. *Periodontol* 2000. 2010;54(1):53-70. doi: 10.1111/j.1600-0757.2009.00333.x
 30. Burns E, Bachrach G, Shapira L, Nussbaum G. Cutting Edge: TLR2 is required for the innate response to *Porphyromonas gingivalis*: Activation leads to bacterial persistence and TLR2 deficiency attenuates induced alveolar bone resorption. *Immunol.* 2006;177(12):8296-8300. doi: 10.4049/jimmunol.177.12.8296.
 31. Zhou Q, Desta T, Fenton M, Graves DT, Amar S. Cytokine profiling of macrophages exposed to *Porphyromonas gingivalis*, its lipopolysaccharide, or its FimA protein. *Infect Immun.* 2005 Feb;73(2):935-43. doi: 10.1128/IAI.73.2.935-943.2005.
 32. Preshaw PM, Taylor JJ. How has research into cytokine interactions and their role in driving immune responses impacted our understanding of periodontitis? *J Clin Periodontol.* 2011;38(1):60-84. doi: 10.1111/j.1600-051X.2010.01671.x.

33. Finoti LS, Nepomuceno R, Pigossi SC, Corbi SCT, Secolin R, Scarel-Caminaga RM. Association between interleukin-8 levels and chronic periodontal disease PRISMA-compliant systematic review and meta-analysis. *Medicine*. 2017;96(22):1-8. doi: 10.1097/MD.00000000000006932.
34. Bormann KH, Stühmer C, Z'Graggen M, Kokemöller H, Rücker M, Gellrich NC. IL-1 polymorphism and periimplantitis: a literature review. *Schweiz Monatsschr Zahnmed*. 2010;120(6):510-20.
35. Wang F, Jiang Y, Huang X, Liu Q, Zhang Y, Wenping LW, et al. Pro-Inflammatory Cytokine TNF- α Attenuates BMP9-Induced Osteo/ Odontoblastic Differentiation of the Stem Cells of Dental Apical Papilla (SCAPs). *Cell Physiol Biochem*. 2017;41(5):1725-1735. doi: 10.1159/000471865.
36. Turner MD, Nedjai B, Hurst T, Pennington DJ. Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1843(11):2563-2582. doi: 10.1016/j.bbamcr.2014.05.014.
37. Romagnani, S. Cytokines and chemoattractants in allergic inflammation. *Mol Immunol*. 2002;38(12-13):881-5. doi: 10.1016/s0161-5890(02)00013-5.
38. Schieranol G, Bassil F, Gassinol G, Mareschi K, Bellone G, Pretil G. Cytokine production and bone remodeling in patients wearing overdentures on oral implants. *J Dent Res*. 2000;79(9):1675-82. doi: 10.1177/00220345000790090701.

SUBTITLES OF FIGURES

Figure 1 - Representative dot plot graphs showing the strategy of analysis and the selection of phenotypically identified granulocyte (CD66b⁺) populations.

Figure 2 - Granulocyte (CD66b⁺) viability assessed by Live and Dead method after experimental conditions. Results expressed as percentage of viable cells for Live and Dead method. Ale: sodium alendronate; Pg: *P. gingivalis*. Error bars indicate standard deviation. Data from 10 donors are shown. * represents a significant difference ($p < 0.05$) between the control group and the group stimulated with Pg (t test); connecting lines represent significant differences ($p < 0.05$) between the groups treated and not treated with Ale (t test).

Figure 3 - The effect of sodium alendronate on the frequencies of positive cells and median fluorescence intensity (MFI) of CD66b, DHR123, TLR2 and TLR4 in CD66b⁺ granulocytes stimulated or not with *P. gingivalis*. Ale: sodium alendronate; Pg: *P. gingivalis*. Error bars indicate standard deviation. Data from 10 donors are shown.

* represents a significant difference ($p < 0.05$) between the control group and cells stimulated with Pg (t test); connecting lines represent significant differences ($p < 0.05$) between the groups treated or not treated with Ale (t test).

Figure 4 - The effect of sodium alendronate on the frequencies of positive cells and median fluorescence intensity (MFI) of cytokines in CD66b⁺ granulocytes stimulated or not with *P. gingivalis*. Ale: sodium alendronate; Pg: *P. gingivalis*. Error bars indicate standard deviation. Data from 10 donors are shown.

* represents a significant difference ($p < 0.05$) between the control group and cells stimulated with Pg (t test); connecting lines represent significant differences ($p < 0.05$) between the groups treated or not treated with Ale (t test).

6.2 Artigo Científico 2

Com o objetivo de avaliar o efeito de concentrações de uso tópico de alendronato de sódio na atividade de monócitos humanos e suas subpopulações estimulados com *P. gingivalis*, foram realizadas incubações com sangue total de doadores saudáveis, imunomarcção de moléculas envolvidas nas respostas imunoinflamatórias e análise por citometria de fluxo. Os resultados foram compilados na forma de artigo científico intitulado **“Effect of alendronate sodium on the activity of human monocytes stimulated in vitro with Porphyromonas gingivalis”**, que será submetido à análise no periódico **Brazilian Oral Research (Qualis A2)**.

As normas para submissão de artigos podem ser visualizadas no endereço eletrônico: <https://www.scielo.br/journal/bor/about/#instructions>

**Effect of alendronate sodium on the activity of human monocytes stimulated in vitro
with *Porphyromonas gingivalis***

Hércules Henrique Onibene CASTRO^a, Carolina Cattoni KOH^b, Walderez Ornelas DUTRA^{bc}, Natália Rocha GUIMARÃES^c, Paula Prazeres MAGALHÃES^c, Luiz de Macêdo FARIAS^c, Martinho Campolina Rebello HORTA^a, Paulo Eduardo Alencar de SOUZA^a

^a Graduate Program in Dentistry, Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil

^b Departamento de Morfologia, ICB, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil.

^c Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Doenças Tropicais – INCT-DT, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

^d Departamento de Microbiologia, ICB, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil.

Corresponding author:

Dr. Paulo Eduardo Alencar de Souza

Departamento de Odontologia - Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais

Av. Dom José Gaspar, 500, Prédio 46, Sala 101 - Coração Eucarístico

CEP 30535-901 - Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil

Telefone: +55 31 3319-4414 - E-mail: pauloalencar@pucminas.br.

Abstract

Alendronate sodium (Ale) is widely used to control bone metabolism, especially in patients with osteoporosis. As Ale inhibits osteoclasts and bone resorption, several studies have demonstrated beneficial effects of topical use of 1% Ale gel as a complementary therapy to periodontal treatment. Bisphosphonates can also affect phagocytes and trigger changes in the fight against microorganisms. Macrophages are essential for immunoinflammatory control in the presence of periodontopathogens, as they release cytokines and antimicrobial products. The objective of this work was to evaluate the effect of Ale on the expression of molecules involved in the immunoinflammatory response by human monocytes stimulated in vitro with *Porphyromonas gingivalis* (Pg). For this, peripheral blood from 10 healthy donors was incubated with 1% Ale (0.03M) for 2 hours. Then Pg was added and the samples incubated for another 6 hours. After the lysis of the red blood cells, immunofluorescence reactions were performed for analysis by flow cytometry. Expressions of TLR2, TLR4, DHR123, IL-1 β , IL-8, IL-10, TNF and TGF- β 1 were evaluated in the CD14⁺ monocyte population. Additionally, the expression of cytokines by monocyte subpopulations phenotypically identified by CD14 and CD16 was evaluated. Flow cytometric analysis of the population of total monocytes not stimulated by bacteria showed that Ale reduced the expression of TLR2 and TLR4 and of all evaluated cytokines. In monocytes stimulated with Pg, Ale reduced the expression of TLR4, IL-1 β , IL-8, TNF, IL-10 and increased the frequency of TLR2⁺ cells. Additionally, the analyzes showed that Ale affected the expression of cytokines preferentially in subpopulations of classical and intermediate monocytes, stimulated or not with Pg. Considering cells not stimulated with Pg, Ale reduced TNF expression only in non-classical monocytes. The data suggest that Ale is able to affect the expression of molecules involved in immunoinflammatory responses by PG stimulated monocytes. Although inhibition of the expression of molecules responsible for the processes of inflammation and destruction of periodontal tissues occurs, contributing to the improvement of periodontal clinical parameters, this modulation may interfere with the mechanisms involved in fighting bacteria in periodontal tissues.

Keywords: Alendronate sodium. Monocytes. *Toll-like receptor*. Citocinas. *Porphyromonas gingivalis*.

Introduction

Periodontal disease affects a large part of the world population, often causing irreversible damage to the supporting and protective periodontal tissue.^{1,2} The main etiological factor of periodontal disease is dysbiotic bacterial plaque, together with a dysregulated immunoinflammatory system, which induces a immunoinflammatory in a susceptible individual, with the release of several chemical mediators, such as cytokines, chemokines, enzymes and reactive oxygen species.³⁻⁵ These molecules participate in the processes of combating periodontopathogenic bacteria and in the mechanisms of fibrous connective tissue degradation and resorption bone³⁻⁵, leading to the appearance of clinical alterations, such as bleeding on probing, increased depth on probing and loss of attachment.^{6,7} Several bacteria participate in the etiopathogenesis of periodontal disease and among the species most found in all stages of the disease, highlights *Porphyromonas gingivalis* (Pg)⁸, whose presence is associated aggravation of the disease.⁹

The treatment of periodontal disease consists of removing bacterial plaque and calculus, maintaining oral hygiene and surgical procedures.¹⁰ Treatments have been proposed as adjuvants in periodontal therapy, including the topical use of bisphosphonates in periodontal sites after scaling and root planning and during periodontal surgery.¹¹⁻¹⁵ Bisphosphonates are drugs used to inhibit bone resorption in different pathological conditions, accumulating in the mineralized bone matrix and inhibiting osteoclast activity.^{16,17}

Sodium alendronate (Ale) is a bisphosphonate widely used in the treatment of osteoporosis.¹⁸ Clinical studies have shown the effect of topical use of Ale in the form of a 1% gel as an adjuvant in non-surgical periodontal treatment, with reduction of all inflammation parameters such as bleeding on probing, clinical attachment level and probing depth.¹¹⁻¹⁵ It is believed that the topical route of administration of bisphosphonates in the treatment of periodontal diseases may be beneficial and generate fewer side effects compared to systemic administration.^{11,19,20}

Bisphosphonates can be endocytosed by phagocytic cells and affect the differentiation and activity of these cells.²¹ Although the inhibitory effects of Ale on osteoclasts are well known, the cellular and molecular mechanisms of action of this bisphosphonate in inflamed periodontal tissues have not yet been described in the literature. As phagocytes play an important role in the processes of combating periodontopathogens and destruction of periodontal tissues, the evaluation of the effects of Ale on the activity of these cells in contact with products of periodontopathogens may contribute to a better understanding of the mechanisms of action of bisphosphonates during periodontal therapy.

The aim of this study was to evaluate the effect of topical therapeutic doses of Ale on the expression of molecules involved in immunoinflammatory responses by human monocytes stimulated in vitro with *P. gingivalis*.

Material and Methods

Alendronate Sodium

In this study sodium alendronate (Rini Life Science Pvt.Ltd, India) (Ale) was used at a final concentration of 1% (0.03M) in cell cultures. Ale was dissolved in Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640) (Sigma Aldrich) medium, moments before use.

Bacteria preparation

Sample of *Porphyromonas gingivalis* (Pg) (ATCC® 33277™, Manassas, VA, USA) was cultured in *Brain Heart Infusion Agar* (BHI - Difco, Sparks, MD, USA), supplemented with 0.1% porcine hemin (Inlab Confiança, Diadema, SP, Brazil), 0.5% yeast extract (Difco, Sparks, MD, USA) and 0.1% de menadione (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), and enriched with 5% sheep blood (BHIA-S/E), pH 7.2. The bacteria were incubated for 5 days in an anaerobic chamber (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) with na atmosphere of 85% N₂, 5% CO₂ and 10% H₂, at 37°C. The colonies were transferred to tubes containing saline solution, homogenized and adjusted to an OD_{600nm} of 0,9 in a spectrophotometer (Micronal, S. A., SP, Brazil). The bacteria were then washed with PBS and inactivated by heating at 100°C for 30 minutes. The samples were kept at -80°C for use in the experiments.

Blood samples

Approximately 20 ml of blood were collected from ten healthy voluntary donors through peripheral vein puncture, using tubes containing heparin (Becton Dickinson Vacutainer®, USA). Exclusion criteria were: individuals with immunosuppression, periodontal disease, systemic infectious disease, smokers, chronic alcoholics, autoimmune disease, chronic inflammatory diseases or who were undergoing treatment with chemotherapy, antineoplastic, antibiotic, immunosuppressive or anti-inflammatory drugs in the last 30 days. All volunteers were clinically examined to verify the absence of periodontal disease. This work was approved by the Research Ethics Committee ot the Pontifical Catholic University of Minas Gerais (CAAE: 61550216.0.0000.5137) and conducted in accordance with current regulations.

Treatment with alendronate sodium and stimulation with *P. gingivalis*

Based on the concentration of alendronate sodium used clinically in periodontal treatment, a final concentration of 1% (0.03M) was defined in short-term cultures. Previous experiments performed by our research group showed that this concentration does not significantly affect the cell viability of human granulocytes. Samples of 1 ml of blood from each donor were transferred to polypropylene tubes and then Ale was added at a final concentration of 0.03M. The samples were kept in an oven at 37°C, 5% CO₂, for 2 hours. Then, heat inactivated Pg was added at a final concentration of 5x10⁵ UFC/ml and the samples were incubated for another 6 hours in a CO₂ oven. Four hours before the end of incubation, in all experimental groups, Brefeldin A (1 µg/ml) (eBioscience, San Diego, CA, USA), was added to the tubes intended for cytokine immunostaining.

At the end of the treatments, the blood samples were transferred to 50 ml conical tubes and 20 ml of lysis solution (8,26g/L NH₄Cl; 1g/L KHCO₃; 37,2mg/L Na₂EDTA), were added for each 1 ml of blood. The samples were incubated for 15 minutes at room temperature, protected from light, with gentle agitation, for the lysis of red blood cells. After centrifugation at 600g for 10 minutes at 4°C, the supernatant was discarded and the cells washed twice with phosphate-buffered saline (PBS) by means of centrifugation. Cells were resuspended in PBS and distributed into wells of 96-well-U-bottom plates for immunostaining. Cells were added to each well in proportion to the volume of 400 µL of blood.

Two experimental groups were obtained: cells stimulated or not with Pg. In each group, the effect of Ale on the expression of the markers was evaluated, thus obtaining four experimental conditions: Control (RPMI); Ale (Sodium Alendronate); Pg (*P. gingivalis*); Ale+Pg (Sodium Alendronate + *P. gingivalis*).

Cell viability analysis

Cell viability was assessed using Live/Dead labeling. Cells were incubated for 30 minutes at 4°C with Live/Dead (bv421) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and anti-CD14 (FITC, clone M5E2, BioLegend) for phenotypic identification of granulocytes. Then, the cells were washed with PBS 0.5% fetal bovine serum (FBS), fixed with 2% formaldehyde in PBS for 15 minutes at room temperature, and washed again with PBS. Cells were kept at 4°C until acquisition of 100.000 events per tube on the FACSCanto II flow cytometer (Becton Dickinson, New Jersey, USA).

Evaluation of the production of reactive oxygen species

To evaluate the production of reactive oxygen species, especially hydrogen peroxide, cells were incubated for 30 minutes at 4°C with anti-CD14 antibody (FITC, clone M5E2, BioLegend), dihydrorodamine 123 (DHR123) (Life Technologies, Molecular Probes, Oregon, USA) and Live/Dead (bv421) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Then, they were washed with PBS 0.5% fetal bovine serum (FBS), fixed with 2% formaldehyde in PBS for 15 minutes at room temperature, washed with PBS and kept at 4°C, until the acquisition of 100.000 events per tube in the FACSCANTO II flow cytometer (Becton Dickinson, New Jersey, USA).

Immunofluorescence reactions for TLR and cytokine labeling

Cells were incubated with Live/Dead (bv421) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and anti-CD14 (FITC ou APC, clone M5E2, BioLegend), anti-TLR2 (FITC, clone TL2.1, BioLegend) and anti-TLR4 (APC, clone HTA125, BioLegend), for 30 minutes at 4°C. Then, they were washed with PBS 0.5 % fetal bovine serum (FBS), fixed with 2% formaldehyde in PBS for 15 minutes at room temperature, and washed again with PBS. After fixation, cells were permeabilized with 0.5% saponin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), for 15 minutes at room temperature for intracytoplasmic labeling. Were added Anti-IL-1 β monoclonais (ALEXA FLUOR 647, clone JK1B-1, BioLegend), IL-8 (PerCP-Cy5, clone BH0814, BioLegend), IL-10 (PE/Cy7, Clone JES3-19F1, BioLegend), TNF (PE/Cy7, clone MAb11, Biolegend), LAP (TGF- β 1) (PE/Cy7, clone TW4-2F8, BioLegend) and the cells kept for 30 minutes at room temperature. After washing with 0.5% saponin and PBS, the cells were made in a FACSCanto II cytometer (Becton Dickinson, New Jersey, USA), with acquisition of 100.000 events per tube. Unlabeled cells and isotype controls conjugated to the fluorochromes FITC, PE, PE/Cy7, APC, ALEXA FLUOR 647 and PerCP-Cy5 were added to the experiments.

Flow cytometry

FlowJo x software (Tree Star Inc., USA) was used for flow cytometric analysis. For the analysis of monocyte cell viability, CD14⁺ populations were initially selected and within these populations the percentages of cells labeled for Live/Dead were quantified. To analyze the expression of the molecules involved in the immunoinflammatory responses, viable cells were initially selected by Live/Dead staining and then, populations of CD14⁺ cells (total monocytes) were selected (Fig.1). The percentages of positive cells were quantified and the median fluorescence intensity (MIF) for DHR123, TLR2, TLR4, IL-1 β , IL-8, TNF, IL-10 and TGF- β 1

in the total monocyte population (CD14⁺) were determined. To analyze the different subpopulations of CD14⁺ monocytes, based on the CD14 versus CD16 plot, subpopulations classical (CD14⁺CD16⁻), intermediate (CD14⁺CD16⁺) and non-classical (CD14^{low}CD16⁺) monocytes were selected (Fig.1). In the phenotypically identified subpopulations of monocytes, the frequencies of cytokine-positive cells were evaluated.

Statistical analysis

The Kolmogorov-Smirnov normality test was used to verify the distribution of data in each experimental group. To verify the existence of differences in the expression of markers between the control group and the group stimulated with Pg and between the groups treated or not with Ale, the Wilcoxon or paired Student's tests were used, with a significance level of 5%. Analyzes were performed using Graphpad Prism 5.01 software (GraphPad Software, San Diego, California, USA) (Fig.1).

Results

Analysis of monocyte cell viability in different treatments

Cell viability analysis by Live/Dead staining showed that 1% Ale was not able to significantly affect the viability of human monocytes (Fig.2). Stimulation with Pg significantly reduced the viability of CD14⁺ monocytes, although the frequencies of viable cells after stimulation with Pg still remained high ($96 \pm 1,2\%$) (Fig. 2).

Ale effect on the production of reactive oxygen species by monocytes

In the bacterially unstimulated CD14⁺ monocyte population, exposure to Ale did not significantly alter the expression of DHR123 (Fig. 3A e B).

Pg stimulation significantly increased the frequency of DHR123 positive cells (Fig.3A). Considering Pg-stimulated cells, Ale treatment did not significantly affect DHR123 expression (Fig. 3A and B).

Ale effect on TLR2 and TLR4 expression by monocytes

Ale treatment significantly reduced TLR4⁺ cell frequencies (Fig.3E) and TLR2 and TLR4 (Fig.3D e F) in CD14⁺ monocytes not stimulated with bacteria.

Pg stimulation significantly reduced the frequency of TLR2⁺ cells (Fig. 6C) and significantly increased the frequency of TLR4⁺ cells (Fig.3E) in the CD14⁺ monocytes population. Considering Pg stimulated CD14⁺ monocytes, Ale treatment increased the

frequency of TLR2⁺ cells (Fig. 3C) and significantly reduced the frequencies of positive cells and TLR4 MIF (Fig. 3E and F).

Ale effect on cytokine expression by monocytes

Ale exposure significantly reduced the frequencies of IL-1 β , IL-8, TNF, IL-10 and TGF- β 1 (Fig. 4A, C, E, G and I), as well as the MIFs of TNF and TGF- β 1 (Fig. 4F and J) in bacterially unstimulated CD14⁺ monocyte population.

Stimulation with Pg significantly increased the frequencies and MIF of the cytokines IL-1 β , IL-8, TNF and IL-10 (Fig. 4A to F) but reduced the frequency of positive cells and the MIF of TGF- β 1 (Fig. 4I and J) in the CD14⁺ monocyte population. Considering the cells stimulated with Pg, exposure to Ale reduced frequencies of positive cells and the MIF of IL-1 β , IL-8 and TNF (Fig. 4B, D and F) and also reduced the frequency of IL-10⁺ cells (Fig. 4G), partially reversing the effects of the bacteria on the expression of these cytokines in the CD14⁺ monocyte population.

Ale effect on cytokine expression by monocyte subpopulations

Exposure to Ale, in the groups not stimulated with Pg, significantly reduced the frequencies of IL-8 and IL-10 producing cells in the classical (CD14⁺CD16⁻) and intermediate (CD14⁺CD16⁺) monocyte subpopulations, the frequencies of TNF producing cells in the non-classical monocyte subpopulation (CD14^{low}CD16⁺) and the frequencies of TGF- β 1 producing cells in the classical monocyte subpopulation (Fig.5).

Stimulation with Pg significantly increased the frequencies of IL-1 β , IL-8 and TNF positive cells in the three subpopulations evaluated and increased the frequencies of IL-10⁺ cells only in the classic and intermediate subpopulations (Fig. 5). Regarding the expression of TGF- β 1, exposure to Pg significantly reduced the frequencies of cells positive for this cytokine only in the subpopulation of classical monocytes (Fig. 5). Considering Pg-stimulated cells, Ale exposure reduced the frequencies of IL-1 β and IL-10 positive cells only in the classical and intermediate monocyte subpopulations (Fig. 5). Ale also reduced the frequencies of IL-8 positive cells in all three subpopulations and the frequencies of TNF⁺ cells in the classical monocyte subpopulation (Fig. 5).

Discussion

Clinical studies showed that the topical use of 1% Ale as an adjuvant treatment to non-surgical periodontal therapy improved the clinical patterns of periodontal inflammation.¹¹⁻¹⁵ There are no studies in the literature evaluating the effect of Ale on the activity of monocytes stimulated with periodontopathogens. As monocytes are very sensitive cells to bisphosphonates²¹, in the present study we evaluated the effects of Ale at concentrations of topical periodontal use on the expression of molecules involved in the immunoinflammatory response by monocytes stimulated *in vitro* with Pg.

Our data showed that exposure to Ale at a final concentration of 1% in cultures did not affect cell viability of total monocytes stimulated or not with Pg, demonstrating the biocompatibility of this bisphosphonate at concentrations of topical periodontal use. Stimulation with Pg reduced the viability of total monocytes in relation to the control, which has already been observed in other studies with stimulation of leukocytes with microbial products *in vitro*. However, the frequencies of viable cells still remained high in the group stimulated with Pg.

The analysis of dihydrorodamine 123 (DHR123), a marker of reactive oxygen species (ROS) related to respiratory burst and microbicidal activity of phagocytes, also showed that Ale was not able to affect the expression of this molecule, both by monocytes stimulated and not stimulated with Pg. These data suggest that Ale can play a periodontal anti-inflammatory effect without affecting ROS production by monocytes. However, it is important to consider that the kinetics of ROS production may vary at periodontal sites in response to periodontopathogens and the evaluation of microbicidal activity, as well as studies in animal models, are important to confirm the effects of Ale on the mechanisms of combating periodontal pathogens.

For the recognition of components of gram-negative bacteria by the cells of the innate immune response in periodontitis to occur, specific receptors are required, the most important being the toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4.²²⁻²⁵ Activation of these receptors has already been shown to be essential for the progression of periodontitis in animal models and in humans.^{26,27} In our work, exposure to Ale reduced the expression of TLR2 and TLR4 by CD14+ monocytes, which could decrease the response of monocytes to bacterial products, contributing to the reduction of periodontal inflammation. However, the microbicidal activity of these cells is also stimulated by the recognition of molecular patterns of pathogens by the TLR receptors and the reduction in the expression of these molecules could affect the fight against periodontopathogens.

Pg lipopolysaccharides (LPS) activate monocytes by binding to TLR2 and TLR4, which stimulates the production of several cytokines.²⁸ A study evaluating cells from patients with periodontal disease showed that there was no increase in the expression of TLR2 and TLR4 in macrophages stimulated with LPS of Pg.²⁹ In our work, there was greater stimulation of TLR4 when CD14⁺ monocytes were stimulated with Pg. A study evaluating macrophages deficient in TLR2 and TLR4 showed that the increased production of cytokines induced by LPS from Pg was dependent on signaling via TLR2, while other components of this bacterium induce cytokine production through signaling via both TLR2 and TLR4.²⁸ Our data showed that although Pg stimulation reduced the frequencies of TLR2⁺ monocytes, exposure of these cells to Ale increased the frequencies of cells expressing this receptor. These data suggest that Ale may try to reverse the inhibition of TLR2 expression induced by Pg. An inverse effect was observed on the expression of TLR4, since Pg increased the frequencies of TLR4⁺ cells and exposure to Ale reduced the expression of this receptor in monocytes stimulated and not stimulated with Pg. Likewise, Ale appears to reverse the effects of Pg on TLR4 expression. Studies evaluating the intracellular signaling pathways of TLRs may contribute to elucidate the effects of Ale on the modulation of TLR2 and TLR4 expression in Pg-stimulated monocytes.

During the progression of periodontal disease, monocytes release several inflammatory mediators when they recognize bacterial LPS, such as pro-inflammatory cytokines IL-1 β , TNF and IL-8 potentiating the inflammatory response, but inducing periodontal tissue degradation.³⁰⁻³⁵ In the present study, exposure of total monocytes to Ale reduced the expression of all cytokines evaluated. The reduction in the expression of pro-inflammatory cytokines, such as IL-1 β , TNF and IL-8 may contribute to the clinical effects observed in periodontal tissues, such as reduced bleeding and bone loss.^{11,14,15} However, Ale also reduced the expression of anti-inflammatory cytokines, such as IL-10 and TGF- β 1, which are involved in the regulation of immunoinflammatory responses, inhibition of extracellular matrix degradation and bone resorption, and stimulation of tissue repair.³⁶⁻³⁸ The reduction in the expression of several cytokines by monocytes may represent a broader effect of Ale on the activity of these cells without, however, affecting their viability. Furthermore, the balance of expression of various inflammatory mediators is what determines the cellular and tissue effects of the inflammatory process in periodontal tissues.

In the present study, stimulation with Pg increased the expression of IL-1 β , IL-8, TNF, IL-10 and reduced the expression of TGF- β 1 by CD14⁺ monocytes. Other studies in the literature have also shown that stimulation of macrophages with Pg causes an increase in the

production of TNF- α , IL-1 β and IL-10.³⁹⁻⁴² The effects of stimulation of cells *in vitro* with Pg should be carefully analyzed, as differences in the cytokine expression has been described when using the whole bacterium, different strains of the bacterium or isolated virulence factors.^{29,43,44} In the present study, heat-inactivated Pg was used. In addition, the interaction of leukocytes with products from other bacterial species present at periodontal sites can also affect the stimulation of cytokine expression.

In the present study, Ale exposure reduced the expression of pro-inflammatory cytokines by Pg-stimulated total monocytes. A study carried out in monkeys with systemic administration of Ale at 0.25 mg/kg, as therapy in the treatment of periodontal resorption, showed that this drug increased the levels of IL-6 and IL-1 β in periodontal tissues.⁴⁵ Other cellular sources besides the monocytes may be involved in the production of pro-inflammatory cytokines, and the concentrations and routes of administration of bisphosphonates may also influence the effects of these drugs on leukocyte activity.^{11,14,15} In the present study, while Pg increased the expression of IL-10, Ale also reduced the frequencies of monocytes that produce this cytokine. Although IL-10 acts by inhibiting bone resorption and the expression of pro-inflammatory cytokines, the inhibition of this cytokine expression by Ale may not impair the clinically observed anti-inflammatory effects, as this bisphosphonate was also able to significantly reduce the expression of cytokines IL-1 β , IL-8 e TNF by monocytes.

Based on the expression of CD14 and CD16 molecules, the following subpopulations of monocytes were identified in previous studies: classic (CD14+CD16-), intermediate (CD14+CD16+) and non-classical (CD14^{low}cd16+).⁴⁶⁻⁴⁸ These subpopulations have distinct functional characteristics, such as cytokine production profile and antigen presentation potential.⁴⁶⁻⁴⁸

When evaluating the frequencies of cytokine producing cells within the subpopulations of monocytes not stimulated with Pg, we observed that exposure to Ale differently affected the expression of the evaluated cytokines, with a reduction of IL-8 and IL-10 cytokines in classical and intermediates, reduction of TNF in non-classical and TGF- β 1 only in classical. Previous studies have shown a higher concentration of non-classical monocytes and a lower concentration of classical monocytes in patients with chronic periodontitis.^{49,50} A study also showed an increase in the concentration of non-classical monocytes when stimulated by the bacteria *Salmonella Minnesota*.⁵² Classical monocytes are less differentiated, while non-classical monocytes are derived from classical monocytes and are more mature⁴⁶, respond poorly to bacterial signals and are more responsive to virus associated signals.⁵¹

In the present study, stimulation with Pg increased the expression of pro-inflammatory cytokines in all monocyte subpopulations and the expression of IL-10 in classical and intermediate monocytes. Only in classical monocytes did Pg stimulation reduce the expression of TGF- β 1. When comparing the effects of Ale and Pg on classical and intermediate monocytes, we observed that Ale acts inversely to stimulation with Pg on the expression of all cytokines, except for TGF- β 1, in which Ale reduces its expression in a similar way to Pg. The reduction in TGF- β 1 expression may interfere with the tissue repair process, since the secretion of this cytokine by macrophages is increased in the resolution phase of the inflammatory process, stimulating repair mechanisms.⁵³

In the present study, under Pg stimulation, we observed that Ale preferentially affects the expression of cytokines by classical and intermediate monocytes, reducing the expression of both pro-inflammatory cytokines and the anti-inflammatory cytokine IL-10. Subpopulations of classical and intermediate monocytes are more involved with bacterial responses and stimulation of inflammatory mechanisms.⁴⁸ Although studies have shown an increase in the population of non-classical monocytes in patients with periodontal disease, it is necessary to assess whether this profile is maintained after periodontal therapy, with reduced bacterial colonization, at which time Ale has been used.

This is a preliminary study that showed that the use of alendronate sodium at 1% as an adjuvant in periodontal treatment can significantly affect the expression of several molecules involved in the immunoinflammatory process, related to microbial combat and the destruction of periodontal tissues. Although the reduction in the expression of several pro-inflammatory cytokines may reduce the destruction of periodontal tissues, the effect of this modulation on the antibacterial activity of monocytes in periodontal tissues should be further investigated. Studies in experimental models and clinical trials may clarify the effects of Ale on cellular activity in periodontal tissues during periodontal treatment.

References

1. Demmer RT, Papapanou PN. Epidemiologic patterns of chronic and aggressive periodontitis. *Periodontology* 2000. 2010;53:28–44. doi: 10.1111/j.1600-0757.2009.00326.x.
2. Frencken JE, Sharma P, Stenhouse L, Green D, Lavery D, Dietrich T. Global epidemiology of dental caries and severe periodontitis - a comprehensive review. *J Clin Periodontol*. 2017;44 Suppl 18:S94–S105. doi: 10.1111/jcpe.12677.
3. Holt SC, Ebersole JL. *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia*: the ‘red complex’, a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis. *Periodontol* 2000. 2005;38(1):72-122. doi: 10.1111/j.1600-0757.2005.00113.x.
4. Highfield, J. Diagnosis and classification of periodontal disease. *Aust Dent J*. 2009;54(1):11-26. doi: 10.1111/j.1834-7819.2009.01140.x.
5. Liu YC, Lerner UH, Teng YT. Cytokine responses against periodontal infection: protective and destructive roles. *Periodontol* 2000. 2010;52(1):163-206. doi: 10.1111/j.1600-0757.2009.00321.x.
6. Goutoudi P, Diza E, Arvanitidou M. Effect of periodontal therapy on crevicular fluid interleukin-1beta and interleukin-10 levels in chronic periodontitis. *J Dent*. 2004;32(7):511-20. doi: 10.1016/j.jdent.2004.04.003.
7. Chapple ILC, Mealey BL, Van Dyke TE, Bartold PM, Dommisch H, Eickholz P, et al. Periodontal health and gingival diseases and conditions on an intact and a reduced periodontium: Consensus report of workgroup 1 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Periodontol*. 2018;89(1):74-84. doi: 10.1002/JPER.17-0719.
8. Adler CJ, Dobney K, Weyrich LS, Kaidonis J, Walker AW, Haak W, et al. Sequencing ancient calcified dental plaque shows changes in oral microbiota with dietary shifts of the Neolithic and Industrial revolutions. *Nature Genet*. 2013;45:450-5. doi: 10.1038/ng.2536.
9. Ata-Ali J, Flichy-Fernández AJ, Alegre-Domingo T, Ata-Ali F, Palacio J, Peñarrocha-Diago M. Clinical, microbiological, and immunological aspects of healthy versus peri-implantitis tissue in full arch reconstruction patients: a prospective cross-sectional study. *BMC Oral Health*. 2015;15(43):1-10. doi: 10.1186/s12903-015-0031-9.
10. Lindhe J, Lang NP. Tratado de periodontia clínica e implantodontia oral. 6a ed. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan, 2018.

11. Pradeep AR, Sharma A, Rao NS, Bajaj P, Naik SB, Kumari M. Local drug delivery of alendronate gel for the treatment of patients with chronic periodontitis with diabetes mellitus: a double-masked controlled clinical trial. *J Periodontol.* 2012;83(10):1322-8. doi: 10.1902/jop.2012.110292.
12. Sharma A, Pradeep AR. Clinical efficacy of 1% alendronate gel as a local drug delivery system in the treatment of chronic periodontitis: a randomized, controlled clinical trial. *J Periodontol.* 2012;83(1):11-18. doi: 10.1902/jop.2011.110091.
13. Sharma A, Pradeep AR. Clinical efficacy of 1% alendronate gel in adjunct to mechanotherapy in the treatment of aggressive periodontitis: a randomized controlled clinical trial. *J Periodontol.* 2012;83(1):19-26. doi: 10.1016/0003-9969(64)90024-x.
14. Pradeep AR, Kumari M, Rao NS, Naik SB. 1% alendronate gel as local drug delivery in the treatment of class furcation defects: a randomized controlled clinical trial. *J Periodontol.* 2013;84(3):307-15. doi: 10.1902/jop.2012.110729.
15. Dutra BC, Oliveira AMSD, Oliveira PAD, Manzi FR, Cortelli SC, Cota LOM, et al. Effect of 1% sodium alendronate in the non-surgical treatment of periodontal intraosseous defects: a 6-month clinical trial. *J Appl Oral Sci.* 2017;25(2): 310-317. doi: 10.1590/1678-7757-2016-0252.
16. Carano A, Teitelbaum SL, Konsek JD, Schlesinger PH, Blair HC. Bisphosphonates directly inhibit the bone resorption activity of isolated avian osteoclasts in vitro. *J Clin Invest.* 1990;85(2):456-61. doi: 10.1172/JCI114459.
17. Coxon FP, Thompson K, Rogers MJ. Recent advances in understanding the mechanism of action of bisphosphonates. *Curr Opin Pharmacol.* 2006;6(3):307-12. doi: 10.1016/j.coph.2006.03.005.
18. Madrid C, Sanz M. What impact do systemically administrated bisphosphonates have on oral implant therapy? A systematic review. *Clin Oral Implants Res.* 2009;20(4):87-95. doi: 10.1111/j.1600-0501.2009.01772.x.
19. Soileau KM. Oral post-surgical complications following the administration of bisphosphonates given for osteopenia related to malignancy. *J Periodontol.* 2006;77(1):738-43. doi: 10.1902/jop.2006.050187.
20. Wang HL, Weber D, Mccauley LK. Effect of long-term oral bisphosphonates on implant wound healing: Literature review and a case report. *J Periodontol.* 2007;78(1):548-94. doi: 10.1902/jop.2007.060239.
21. Roelofs AJ, Jauhiainen M, Mönkkönen H, Rogers MJ, Mönkkönen J, Thompson K. Peripheral blood monocytes are responsible for $\gamma\delta$ T cell activation induced by zoledronic

- acid through accumulation of IPP/DMAPP. *Br J Haematol.* 2009;144(2):245-50. doi: 10.1111/j.1365-2141.2008.07435.x.
22. Matera G, Muto V, Vinci M, Zicca E, Abdollahi-Roodsaz S, Van de Veerdonk FL, et al. Receptor recognition of and immune intracellular pathways for *Veillonella parvula* lipopolysaccharide. *Clin Vaccine Immunol.* 2009;16(12):1804-9. doi: 10.1128/CVI.00310-09.
 23. Harokopakis E, Hajishengallis G. Integrin activation by bacterial fimbriae through a pathway involving CD14, Toll-like receptor 2, and phosphatidylinositol-3-kinase. *Eur J Immunol.* 2005;35(4):1201-10. doi: 10.1002/eji.200425883.
 24. Mahanonda R, Sa-Ard-Iam N, Montreekachon P, Pimkhaokham A, Yongvanichi KT, Fukuda MM, et al. IL-8 and IDO expression by human gingival fibroblasts via TLRs. *J Immunol.* 2007;178(2):1151-7. doi: 10.4049/jimmunol.178.2.1151.
 25. Gaddis DE, Michalek SM, Katz J. Requirement of TLR4 and CD14 in dendritic cell activation by Hemagglutinin B from *Porphyromonas gingivalis*. *Mol Immunol.* 2009;46(13):2493-2504. doi: 10.1016/j.molimm.2009.05.022
 26. Berdeli A, Emingil G, Han Saygan B, Gu'ulkan A, Atilla G, Ko'se T, et al. TLR2 Arg753Gly, TLR4 Asp299Gly and Thr399Ile gene polymorphisms are not associated with chronic periodontitis in a Turkish population. *J Clin Periodontol* 2007;34:551-7. doi: 10.1111/j.1600-051X.2007.01092.x.
 27. Lin M, Hu Y, Wang Y, Kawai T, Wang Z, Han X. Different engagement of TLR2 and TLR4 in *Porphyromonas gingivalis* vs. ligature-induced periodontal bone loss. *Braz Oral Res.* 2017;31(63):e63. doi: 10.1590/1807-3107BOR-2017.vol31.0063.
 28. Zhou Q, Desta T, Fenton M, Graves DT, Amar S. Cytokine profiling of macrophages exposed to *Porphyromonas gingivalis*, its lipopolysaccharide, or its FimA protein. *Infect Immun.* 2005;73(2):935-43. doi: 10.1128/IAI.73.2.935-943.2005.
 29. Lu W, Gu JY, Zhang YY, Gong DJ, Zhu YM, Sun Y. Tolerance induced by *Porphyromonas gingivalis* may occur independently of TLR2 and TLR4. *PLoS One.* 2018;13(7):e0200946. doi: 10.1371/journal.pone.0200946. eCollection 2018.
 30. Séguier S, Gogly B, Bodineau A, Godeau G, Brousse N. Is collagen breakdown during periodontitis linked to inflammatory cells and expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human gingival tissue? *J Periodontol.* 2001;72(10):1398-1406. doi 10.1902/jop.2001.72.10.1398
 31. Kayal RA. The role of osteoimmunology in periodontal disease. *BioMed Res Int.* 2013;2013(1):639368. doi: 10.1155/2013/639368.

32. Crott TN, Dharmapatni AASSK, Alias E, Haynes DR. Osteoimmunology: major and costimulatory pathway expression associated with chronic inflammatory induced bone loss. *J Immunol Res*. 2015;2015(1):281287. doi: 10.1155/2015/281287
33. Varanat M, Haase EM, Kay JG, Scannapieco FA. Activation of the TREM-1 pathway in human monocytes by periodontal pathogens and oral commensal bacteria. *Mol Oral Microbiol*. 2017;32(4):275-287. doi: 10.1111/omi.12169.
34. Borregaard N. Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity*. 2010;33(5):657-70. doi: 10.1016/j.immuni.2010.11.011.
35. Furze RC, Rankin SM. Neutrophil mobilization and clearance in the bone marrow. *Immunology*. 2008;125(3):281-8. doi: 10.1111/j.1365-2567.2008.02950.x.
36. Serhan CN. Resolution phase of inflammation: novel endogenous antiinflammatory and proresolving lipid mediators and pathways. *Ann Rev Immunol*. 2007;25(1):101-37.
37. Martin P, Leibovich SJ. Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly. *Trends Cell Biol*. 2005;15(11):599-607. doi: 10.1016/j.tcb.2005.09.002.
38. Das A, Sinha M, Datta S, Abas M, Chaffee S, Sen CK, et al. Monocyte and macrophage plasticity in tissue repair and regeneration. *Am J Pathol*. 2015;185(10):2596-2606. doi: 10.1016/j.ajpath.2015.06.001.
39. Kim HJ, Cha GS, Kim HJ, Kwon EY, Lee JY, Choi J, et al. Porphyromonas gingivalis accelerates atherosclerosis through oxidation of high-density lipoprotein. *J Periodontal Implant Sci*. 2018;48(1):60-8. doi: 10.5051/jpis.2018.48.1.60.
40. Sun Y, Li H, Yang MF, Shu W, Sun MJ, Xu Y. Effects of aging on endotoxin tolerance induced by lipopolysaccharides derived from Porphyromonas gingivalis and Escherichia coli. *PLoS One*. 2012;7(6):e39224. doi: 10.1371/journal.pone.0039224.
41. Holden JA, Attard TJ, Laughton KM, Mansell A, O'Brien-Simpson NM, Reynolds EC. Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide weakly activates M1 and M2 polarized mouse macrophages but induces inflammatory cytokines. *Infect Immun*. 2014;82(10):4190-203. doi: 10.1128/IAI.02325-14.
42. Sun Y, Li H, Sun MJ, Zheng YY, Gong DJ, Xu Y. Endotoxin tolerance induced by lipopolysaccharides derived from porphyromonas gingivalis and escherichia coli: alternations in toll-like receptor 2 and 4 signaling pathway. *Inflammation*. 2014;37(1):268-76. doi: 10.1007/s10753-013-9737-5.
43. Eick S, Reissmann A, Rodel J, Schmidt KH, Pfister W. Porphyromonas gingivalis survives within KB cells and modulates inflammatory response. *Oral Microbiol Immunol*. 2006;21(4):231-7.

44. Baek KJ, Ji S, Kim YC, Choi Y. Association of the invasion ability of *Porphyromonas gingivalis* with the severity of periodontitis. 2015;6(3):274-81. doi: 10.1080/21505594.2014.1000764.
45. Weinreb M, Quartuccio H, Seedor JG, Aufdemorte TB, et al. Histomorphometrical analysis of the effects of the bisphosphonate alendronate on bone loss caused by experimental periodontitis in monkeys. *J Periodontal Res.* 1994;29(1):35-40. doi: 10.1111/j.1600-0765.1994.tb01088.x.
46. Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, Hart DN, et al. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood.* 2010;116(16):74-80. doi: 10.1182/blood-2010-02-258558.
47. Boyette LB, Macedo C, Hadi K, Elinoff BD, Walters JT, Ramaswami B, et al. Phenotype, function, and differentiation potential of human monocyte subsets. *PLoS One.* 2017;12(4):e0176460. doi: 10.1371/journal.pone.0176460. eCollection 2017.
48. Ziegler-Heitbrock L. The CD14+CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation. *J Leukoc Biol.* 2007;81(3):584-92. doi: 10.1189/jlb.0806510.
49. Jagannathan R, Lavu V, Rao SR. Comparison of the proportion of non-classic (CD14+CD16+) monocytes/macrophages in peripheral blood and gingiva of healthy individuals and patients with chronic periodontitis. *J Periodontol.* 2014;85(6):852-8. doi: 10.1902/jop.2013.120658.
50. Nagasawa T, Kobayashi H, Aramaki M, Kiji M, Oda S, Izumi Y. Expression of CD14, CD16 and CD45RA on monocytes from periodontitis patients. *J Periodontal Res.* 2004;39:72-8. doi: 10.1111/j.1600-0765.2004.00713.x.
51. Cros J, Cagnard N, Woollard K, Patey N, Zhang SY, Senechal B, et al. Human CD14dim monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. *Immunity.* 2010;33(3):375-86. doi: 10.1016/j.immuni.2010.08.012.
52. Belge KU, Dayyani F, Horelt A, Siedlar M, Frankenberger M, Frankenberger B, et al. The proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes are a major source of TNF. *J Immunol.* 2002;168:3536-42. doi: 10.4049/jimmunol.168.7.3536.
53. Stout RD, Suttles J. Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments. *J Leukoc Biol.* 2004;76(3):509-13. doi: 10.1189/jlb.0504272.

Subtitles of Figures

Figure 1 - Representative dot plot graphs showing the strategy of analysis and the selection monocytes (CD14⁺) and their subpopulations phenotypically identified by expression of CD14 and CD16 markers.

Figure 2 - Monocyte (CD14⁺) viability assessed by Live and Dead method after experimental conditions. Results expressed as percentage of viable cells for Live and Dead method. Ale: sodium alendronate; Pg: *P. gingivalis*. Data from 10 donors are shown. Error bars indicate standard deviation.

* represents a significant difference ($p < 0.05$) between the control group and the group stimulated with Pg (t test).

Figure 3 - The effect of sodium alendronate on the frequencies of positive cells and median fluorescence intensity (MFI) of DHR123, TLR2 and TLR4 in CD14⁺ monocytes stimulated or not with *P. gingivalis*. Ale: sodium alendronate; Pg: *P. gingivalis*. Error bars indicate standard deviation. Data from 10 donors are shown.

* represents a significant difference ($p < 0.05$) between the control group and cells stimulated with Pg (t test); connecting lines represent significant differences ($p < 0.05$) between the groups treated or not treated with Ale (t test).

Figure 4 - The effect of sodium alendronate on the frequencies of positive cells and median fluorescence intensity (MFI) of cytokines in CD14⁺ monocytes stimulated or not with *P. gingivalis*. Ale: sodium alendronate; Pg: *P. gingivalis*. Error bars indicate standard deviation. Data from 10 donors are shown.

* represents a significant difference ($p < 0.05$) between the control group and cells stimulated with Pg (t test or Wilcoxon); connecting lines represent significant differences ($p < 0.05$) between the groups treated or not treated with Ale (t test or Wilcoxon).

Figure 5 - The effect of sodium alendronate on the frequencies of cytokine positive cells in monocyte subpopulations stimulated or not with *P. gingivalis*. Ale: alendronate sodium; Pg: *P. gingivalis*. Error bars indicate standard deviation. Data from 10 donors are shown.

* represents a significant difference ($p < 0.05$) between the control group and cells stimulated with Pg (t test or Wilcoxon); connecting lines represent significant differences ($p < 0.05$) between the groups treated or not treated with Ale (t test or Wilcoxon).

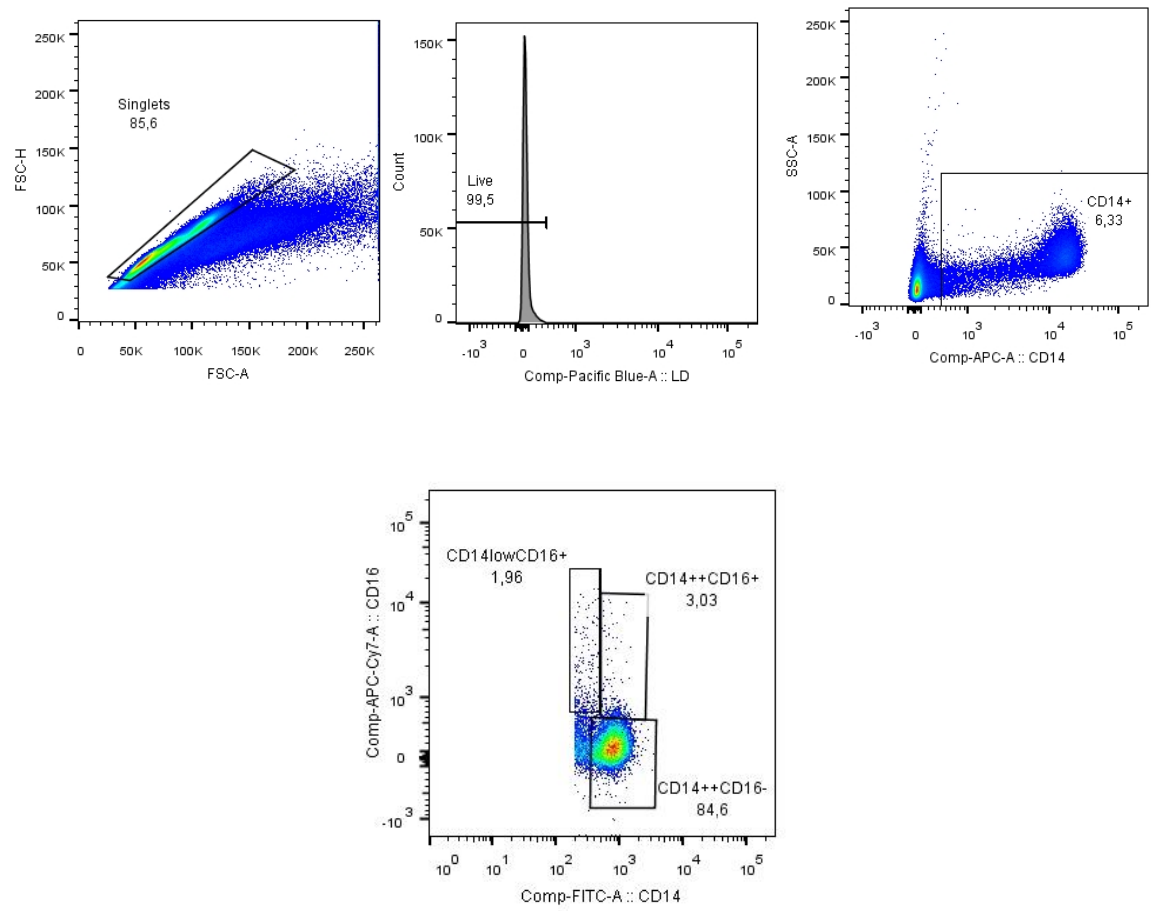


Figure 1 -

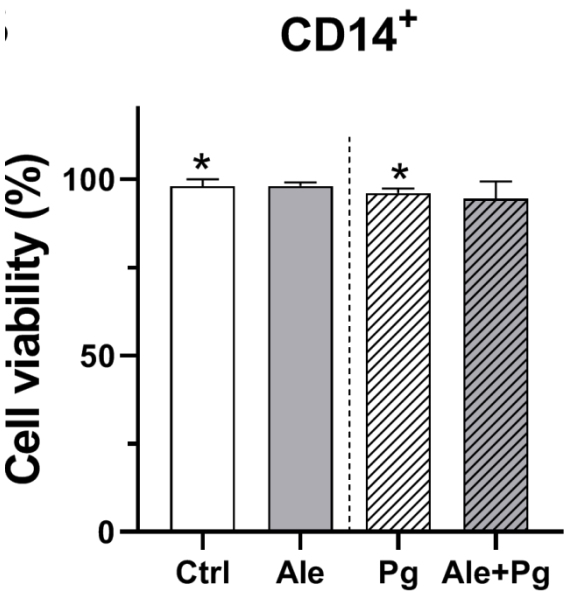


Figure 2 -

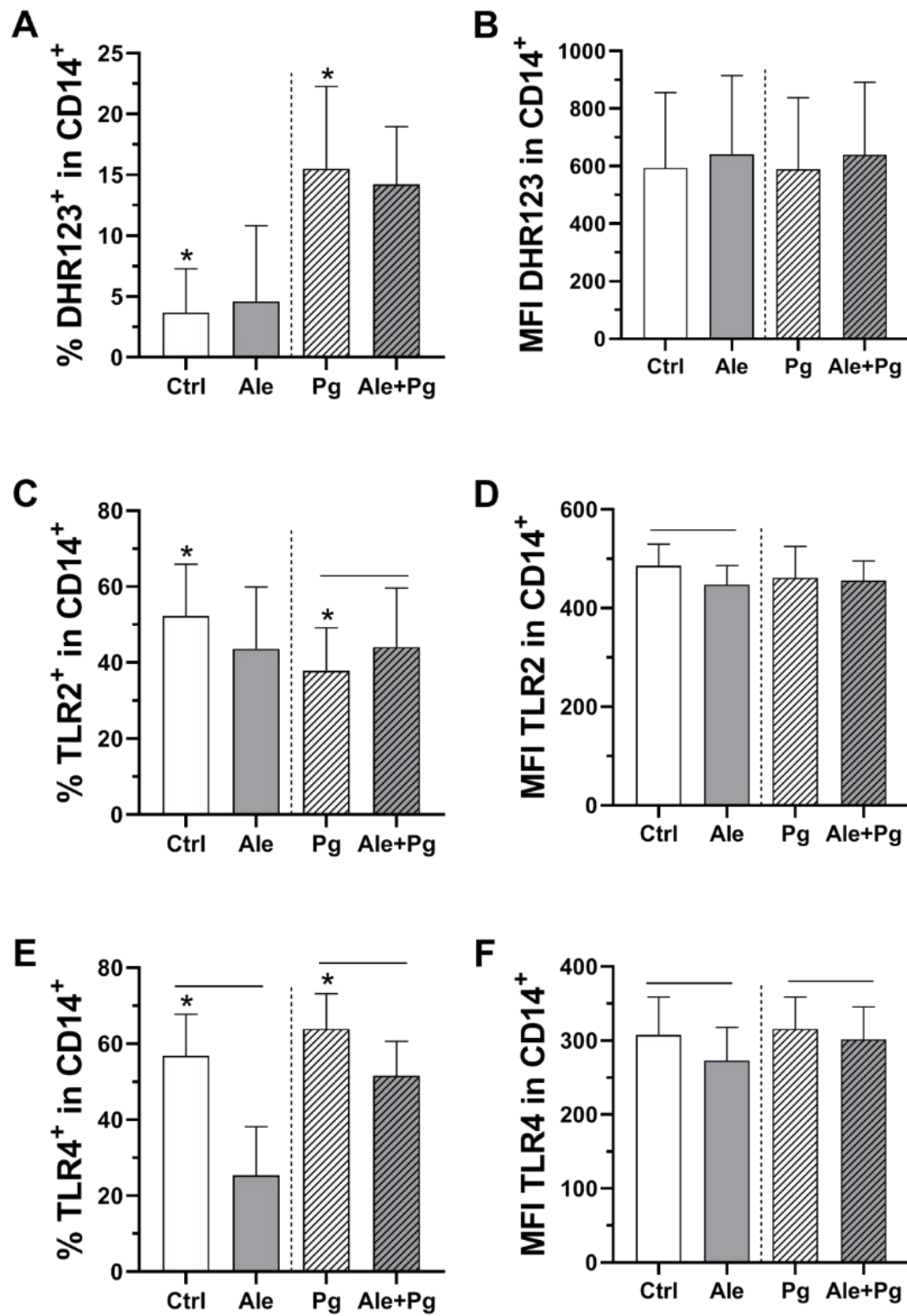


Figura 3 –

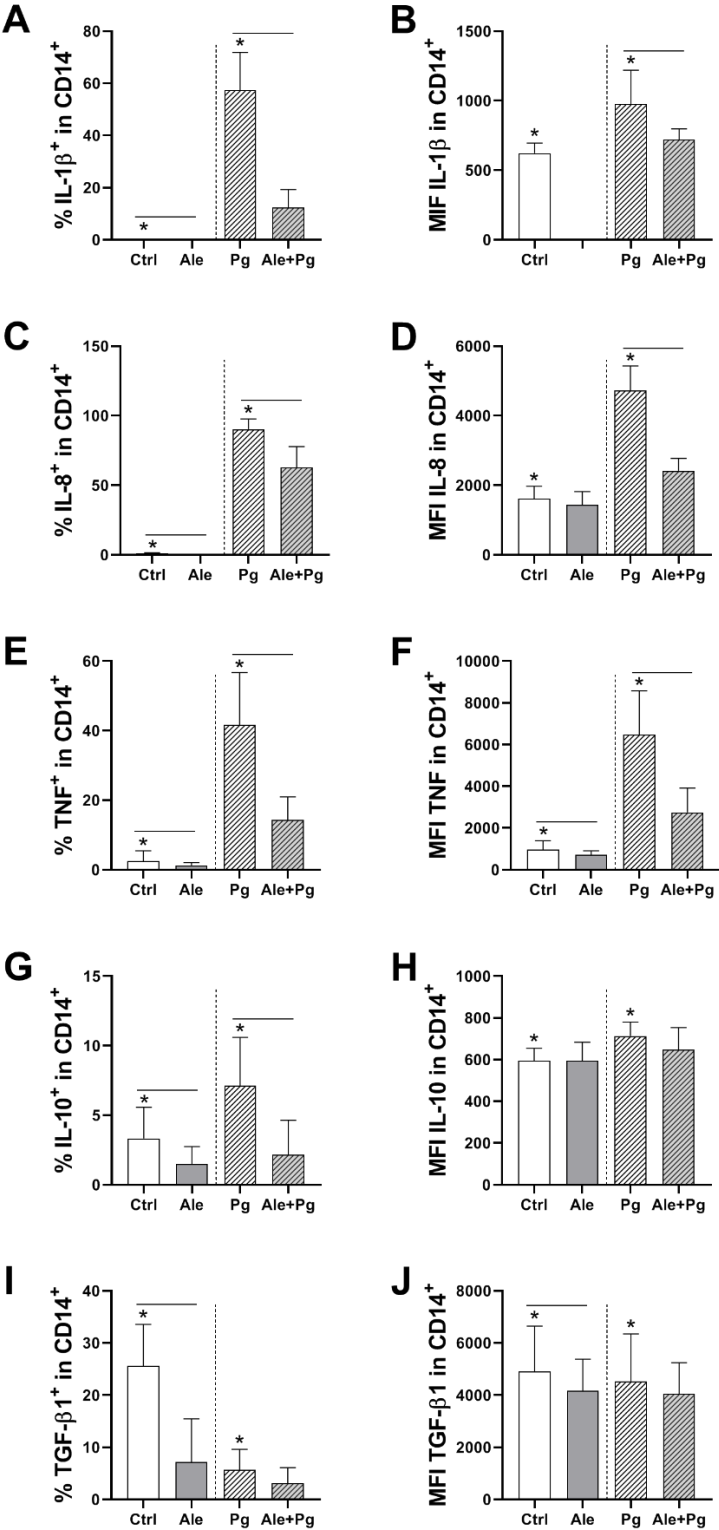


Figure 4 -

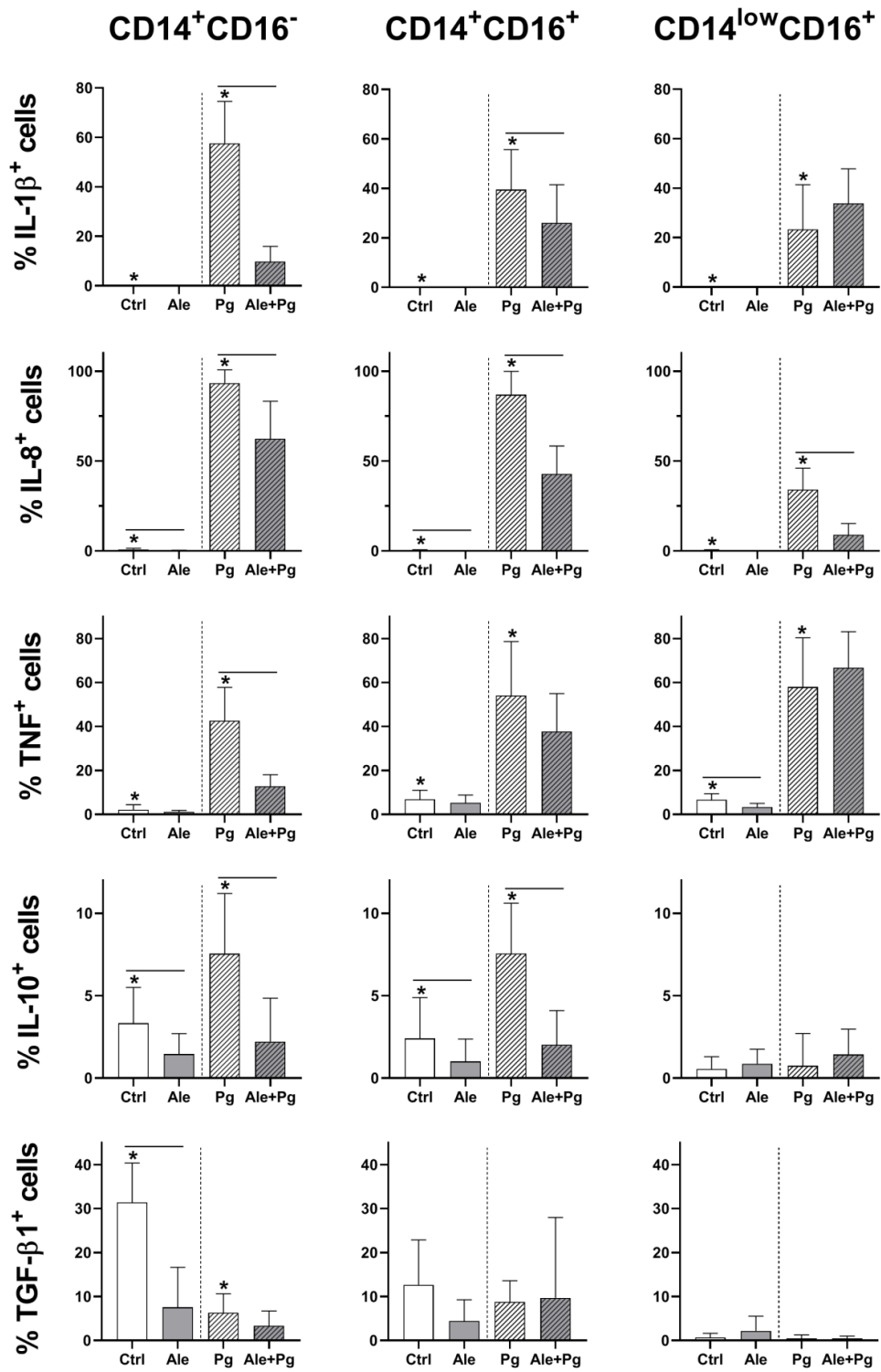


Figure 5 –

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O ambiente periodontal apresenta uma complexa relação entre diversos componentes moleculares, celulares e microbianos, os quais não podem ser reproduzidos neste estudo preliminar *in vitro*. Entretanto os resultados do presente estudo mostraram efeitos do alendronato de sódio em células que participam ativamente dos processos imunoinflamatórios nos tecidos periodontais.

As tabelas 1 e 2 sumarizam os efeitos do alendronato de sódio na expressão dos marcadores avaliados em granulócitos e monócitos, respectivamente. Em ambas as tabelas são apresentados os resultados para células estimuladas ou não com Pg.

Tabela 1: Efeito do alendronato de sódio na expressão dos marcadores por granulócitos humanos (CD66b⁺)

	Células não estimuladas com Pg (CTRL X Ale)	Células estimuladas com Pg (Pg X Ale+Pg)
CD66b	↓ MIF CD66b	↓ MIF CD66b
DHR123	↓ MIF DHR123	↓ % DHR123 ↑ MIF DHR123 ↑ % TLR2
TLR	↓ % e MIF TLR4	↓ MIF TLR2 e TLR4
Citocinas	↓ MIF IL-8 ↓ MIF TNF	↓ % e MIF IL-1β ↓ % e MIF IL-8 ↑ % TNF ↑ % IL-10

Fonte: Elaborado pelo autor

Tabela 2: Efeito do alendronato de sódio na expressão dos marcadores por monócitos humanos (CD14⁺)

	Células não estimuladas com Pg (CTRL X Ale)	Células estimuladas com Pg (Pg X Ale+Pg)
DHR123	-	-
TLR	↓ MIF TLR2 ↓ % e MIF TLR4	↑ % TLR2 ↓ % e MIF TLR4
Citocinas	↓ % IL-1 β	↓ % e MIF IL-1 β
	↓ % IL-8	↓ % e MIF IL-8
	↓ % e MIF TNF	↓ % e MIF TNF
	↓ % IL-10	↓ % IL-10
	↓ % e MIF TGF- β 1	

Fonte: Elaborado pelo autor

Com base nos resultados deste estudo a utilização de doses tópicas de alendronato de sódio com adjuvante no tratamento periodontal pode afetar significativamente a expressão de diversas moléculas envolvidas no processo imunoinflamatório, relacionadas ao combate microbiano e à destruição dos tecidos periodontais. Embora a redução na expressão de diversas citocinas pró-inflamatórias possa contribuir para a inibição da perda óssea periodontal, o efeito dessa modulação na atividade microbiana de leucócitos nos tecidos periodontais deve ser melhor avaliado. Estudos clínicos e em modelos experimentais poderão elucidar os efeitos teciduais do alendronato de sódio na atividade celular durante o tratamento periodontal.

REFERÊNCIAS

- AGARWAL, S. *et al.* Differential expression of MARX IL- 1b, TNF-a, IL-6 and IL-8 in human monocytes in response to lipopolysaccharides from different microbes. **Journal of Dental Research**, v.74, n.4, p. 1057-1065, Apr. 1995.
- AKRIVOPOULOU, C. *et al.* Aggregatibacter actinomycetemcomitans serotype prevalence and antibiotic resistance in a UK population with periodontitis. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v.10, n.1, p. 54-58, Sept. 2017.
- ALBANDAR, J.M. Global risk factors and risk indicators for periodontal diseases. **Periodontology** 2000, v.29, n.1, p. 177-206, 2002.
- ALBINA, J.E. *et al.* Regulation of macrophage functions by L-arginine. **The Journal of Experimental Medicine**, v.169, n.3, p. 1021-1029, Mar. 1989.
- ALMUBARAK, A. *et al.* Disruption of monocyte and macrophage homeostasis in periodontitis. **Frontiers in Immunology**, v.11, p. 330, Feb. 2020.
- ALQALLAF, H. *et al.* Differential profiles of soluble and cellular toll like receptor (TLR)-2 and 4 in chronic periodontitis. **PLoS ONE**, v.13, n.12, p. e0200231, Dec. 2018.
- AL-SHIBANI, N.K. *et al.* Responses of human neutrophils to nicotine and/or Porphyromonas gingivalis. **Journal of Periodontology**, v.82, n.10, p. 1504-1508, Oct. 2011.
- ARANGO, G.D.; DESCOTEAUX, A. Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. **Frontiers Immunology**, v.5, p. 491, Oct, 2014.
- ATA-ALI, J. *et al.* Clinical, microbiological, and immunological aspects of healthy versus peri-implantitis tissue in full arch reconstruction patients: a prospective cross-sectional study. **BMC Oral Health**, v.15, n.43, p. 1-10, Apr. 2015.
- BADRAN, Z. *et al.* Bisphosphonates in periodontal treatment: a review. **Oral Health & Preventive Dentistry**, v.7, n.1, p. 3-12, Jan. 2009.
- BAEK, K.J. *et al.* Association of the invasion ability of Porphyromonas gingivalis with the severity of periodontitis. **Virulence**, v.6, n.3, p. 274-281, 2015.
- BEAUCHEMIN, N. *et al.* Redefined nomenclature for members of the carcinoembryonic antigen family. **Experimental Cell Research**, v.252, n.2, p. 243-249, Nov. 1999.
- BEHRENS, E.M. Macrophage activation syndrome in rheumatic disease: what is the role of the antigen presenting cell? **Autoimmunity Reviews**, v.7, n.4, p. 305-308, 2008.
- BLACK, D.; BAUER, D. Continuing bisphosphonate treatment for osteoporosis- for whom and for how long? **The New England Journal of Medicine**, v.366, n.22, p. 2051-2053, May 2012.

- BORMANN, K.H. *et al.* IL-1 Polymorphism and periimplantitis: a literature review. **Schweiz Monatsschr Zahnmed**, v.120, n.6, p. 510-515, Nov. 2010.
- BORREGAARD, N. Neutrophils, from marrow to microbes. **Immunity**, v.33, n.5, p. 657-670, Nov. 2010.
- BOYETTE, L.B. *et al.* Phenotype, function, and differentiation potential of human monocyte subsets. **PLoS One**, v.12, n.4, p. e0176460, Apr. 2017.
- BRINKMANN, V. *et al.* Neutrophil extracellular traps kill bacteria. **Science**, v.5, n.303, p. 1532-1535, Mar. 2004.
- BRUNSVOLD, M.A. *et al.* Effects of a bisphosphonate on experimental periodontitis in monkeys. **Journal of Periodontology**, v.63, n.10, p. 825-830, Oct. 1992.
- BURR, D.; RUSSELL, G. Foreword: bisphosphonates. **Bone**, v.49, n.1, p. 1, July 2011.
- BURNS, E. *et al.* Cutting Edge: TLR2 is required for the innate response to *Porphyromonas gingivalis*: Activation leads to bacterial persistence and TLR2 deficiency attenuates induced alveolar bone resorption. **Immunology**, v.177, n.12, p. 8296-8300, Dec. 2006.
- CANDEL-MARTÍ, M.E. *et al.* Interleukins IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 and periimplant disease. An update. **Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal**, v.16, n.4, p. 518-521, July 2011.
- CARAGLIA, M. *et al.* Emerging anti-cancer molecular mechanisms of aminobisphosphonates. **Endocrine-Related Cancer**, v.13, n.1, p. 7-26, Mar. 2006.
- CHANG, M.K. *et al.* Osteal tissue macrophages are intercalated throughout human and mouse bone lining tissues and regulate osteoblast function in vitro and in vivo. **The Journal of Immunology**, v.181, n.2, p. 1232-1244, July 2008.
- CHAPPLE, I.L.C. *et al.* Periodontal health and gingival diseases and conditions on an intact and a reduced periodontium: Consensus report of workgroup 1 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. **Journal of Periodontology**, v.89, n.1, p. 74-84, June 2018.
- CHARON, J.; TOTO, P.D.; GARGIULO, A.W. Activated macrophages in human periodontitis. **Journal of Periodontology**, v.52, n.6, p. 328-335, June 1981.
- CHEN, J. *et al.* Effectiveness of alendronate as an adjunct to scaling and root planning in the treatment of periodontitis: a meta-analysis of randomized controlled clinical trials. **Journal Periodontal Implant Science**, v.46, n.6, p. 382-395, Dec. 2016.
- COOPER, P.R.; PALMER, L.J.; CHAPPLE, I.L. Neutrophil extracellular traps as a new paradigm in innate immunity: friend or foe? **Periodontology 2000**, v.63, n.1, p. 165-197, Oct. 2013.
- CORRAL-GUDINO, L. *et al.* Bisphosphonates for Paget's disease of bone in adults. **The Cochrane Database Systematic Reviews**, v.2017, n.12, p. CD004956, Dec. 2017.

CROS, J. *et al.* Human CD14dim monocytes patrol and sense nucleic acids and viruses via TLR7 and TLR8 receptors. **Immunity**, v.33, n.3, p. 375-386, Sept. 2010.

CROTTI, T.N. *et al.* Osteoimmunology: major and costimulatory pathway expression associated with chronic inflammatory induced bone loss. **Journal of Immunology Research**, v.2015, n.1, p. 281287, May 2015.

DANNEMANN, C. *et al.* Jaw osteonecrosis related to bisphosphonate therapy A severe secondary disorder. **Bone**, v.40, n.4, p. 828-834, Apr. 2007.

DAS, A. *et al.* Monocyte and macrophage plasticity in tissue repair and regeneration. **The American Journal of Pathology**, v.185, n.10, p. 2596-2606, Oct. 2015.

DENG, X. *et al.* Mutual augmentation of the induction of the histamine-forming enzyme, histidine decarboxylase, between alendronate and immuno-stimulants (IL-1, TNF, and LPS), and its prevention by clodronate. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.213, n.1, p. 64-73, Oct. 2005.

DEZEREGA, A. *et al.* Chemokine monocyte chemoattractant protein-3 in progressive periodontal lesions in patients with chronic periodontitis. **Journal of Periodontology**, v.81, n.2, p. 267-276, Feb. 2010.

DUARTE, P.M. *et al.* Do subjects with aggressive and chronic periodontitis exhibit a different cytokine/chemokine profile in the gingival crevicular fluid? A systematic review. **Journal of Periodontal Research**, v.50, n.1, p. 18-27, Feb. 2015.

DUCKER, T.P.; SKUBITZ, K.M. Subcellular localization of CD66, CD67, and NCA in human neutrophils. **Journal of Leukocyte Biology**, v.52, n.1, p. 11-16, 1992.

DUTRA, B.C. *et al.* Effect of 1% sodium alendronate in the non-surgical treatment of periodontal intraosseous defects: a 6-month clinical trial. **Journal of Applied Oral Science**, v.25, n.2, p. 310-317, 2017.

EICK, S. *et al.* Porphyromonas gingivalis survives within KB cells and modulates inflammatory response. **Oral Microbiology and Immunology**, v.21, n.4, p. 231-237, Aug. 2006.

EL-BENNA, J.; DANG, P.M.; GOUGEROT-POCIDALO, M.A. Priming of the neutrophil NADPH oxidase activation: role of p47phox phosphorylation and NOX2 mobilization to the plasma membrane. **Seminars and Immunopathology**, v.30, n.3, p. 279-289, July 2008.

FARRELL, K.B. *et al.* Bisphosphonate conjugation for bone specific drug targeting. **Bone Reports**, v.9, n.3, p. 47-60, July 2018.

FERNANDES, C.; LEITE, R.S.; LANÇAS, F.M. Bisfosfonatos: síntese, análises químicas e aplicações farmacológicas. **Química Nova**, v.28, n.2, p. 274-280, 2005.

FINE, D.H. *et al.* Macrophage inflammatory protein-1 α : a salivary biomarker of bone loss in a longitudinal cohort study of children at risk for aggressive periodontal disease? **Journal of Periodontology**, v.80, n.1, p. 106-113, Jan. 2009.

FINOTI, L.S. *et al.* Association between interleukin-8 levels and chronic periodontal disease B PRISMA-compliant systematic review and meta-analysis. **Medicine**, v.96, n.22, p. 1-8, June 2017.

FRIGERI, L.G.; LIU, F.T. Surface expression of functional IgE binding protein, an endogenous lectin, on mast cells and macrophages. **Journal of Immunology**, v.148, n.3, p. 861-867, Feb. 1992.

FURZE, R.C.; RANKIN, S.M. Neutrophil mobilization and clearance in the bone marrow. **Immunology**, v.125, n.3, p. 281-288, Nov. 2008.

GADDIS, D.E.; MICHALEK, S.M.; KATZ, J. Requirement of TLR4 and CD14 in dendritic cell activation by Hemagglutinin B from *Porphyromonas gingivalis*. **Molecular Immunology**, v.46, n.13, p. 2493-2504, Aug. 2009.

GANGULI, A. *et al.* The interactions of bisphosphonates in solution and as coatings on hydroxyapatite with osteoblasts. **Journal of Materials Science. Materials in Medicine**, v.13, n.10, p. 923-931, Oct. 2002.

GENCO, R.J.; SANZ, M. Clinical and public health implications of periodontal and systemic diseases: An overview. **Periodontology 2000**, v.83, n.1, p. 7-13, June 2020.

GÖLZ, L. *et al.* LPS from *P. gingivalis* and hypoxia increases oxidative stress in periodontal ligament fibroblasts and contributes to periodontitis. **Mediators Inflammatory**, v.2014, n.1, p. 986264, Oct. 2014.

GOUTOUDI, P.; DIZA, E.; ARVANITIDOU, M. Effect of periodontal therapy on crevicular fluid interleukin-1 β and interleukin-10 levels in chronic periodontitis. **Journal of Dentistry**, v.32, n.7, p. 511-520, Sept. 2004.

GOZIOTIS, A. *et al.* Effects of bisphosphonates APD and HEBP on bone metabolism in vitro. **Bone**, v.16, n.4, p. 317-327, Apr. 1995.

GRAVES, D. Cytokines that promote periodontal tissue destruction. **Journal of Periodontology**, v.79, n.8, p. 1585-1591, Aug. 2008.

GU, Y.; HAN, X. Toll-like receptor signaling and immune regulatory lymphocytes in periodontal disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v.21, n.9, p. 3329, May 2020.

GUPTA, A. *et al.* randomized controlled clinical trial evaluating the efficacy of zoledronate gel as a local drug delivery system in the treatment of chronic periodontitis: A clinical and radiological correlation. **National Journal Maxillofacial Surgery**, v.9, n.1, p. 22-32, Jan. 2018.

HAJISHENGALLIS, G.; CHAVAKIS, T.; LAMBRIS, J.D. Current understanding of periodontal disease pathogenesis and targets for host-modulation therapy. **Periodontology** 2000, v.84, n.1, p. 14–34, Oct. 2020.

HAMMARSTROM, S. The carcinoembryonic antigen (CEA) family: structures, suggested functions and expression in normal and malignant tissues. **Seminars in Cancer Biological**, v.9, n.2, p. 67-81, Apr. 1999.

HANAZAWA, S. *et al.* Expression of monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) in adult periodontal disease: increased monocyte chemotactic activity in crevicular fluids and induction of MCP-1 expression in gingival tissues. **Infection and Immunity**, v.61, n.12, p. 5219-5224, Dec. 1993.

HAROKOPAKIS, E.; HAJISHENGALLIS, G. Integrin activation by bacterial fimbriae through a pathway involving CD14, Toll-like receptor 2, and phosphatidylinositol-3-kinase. **European Journal of Immunology**, v.35, n.4, p. 1201-1210, Apr. 2005.

HENSON, P.M.; JOHNSTON, R.B. JR. Tissue injury in inflammation. Oxidants, proteinases, and cationic proteins. **The Journal of Clinical Investigation**, v.79, n.1, p. 669-674, Jan. 1987.

HERATH, T.D. *et al.* Tetra- and penta-acylated lipid A structures of *Porphyromonas gingivalis* LPS differentially activate TLR4-mediated NF- κ B signal transduction cascade and immuno-inflammatory response in human gingival fibroblasts. **PLoS One**, v.8, n.3, p. e58496, 2013.

HIGHFIELD, J. Diagnosis and classification of periodontal disease. **Australian Dental Journal**, v.54, n.1, p. 11-26, Sept. 2009.

HOLDEN, J.A. *et al.* *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide weakly activates M1 and M2 polarized mouse macrophages but induces inflammatory cytokines. **Infection Immunity**, v.82, n.10, p. 4190-4203, Oct. 2014.

HOLT, S.C.; EBERSOLE, J.L. *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia*: the ‘red complex’, a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis. **Periodontology** 2000, v.38, n.1, p. 72-122, Apr. 2005.

ILANGO, P. *et al.* Evaluation of TLR2 and 4 in chronic periodontitis. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v.10, n.6, p. ZC86-9, June 2016.

ITALIANI, P.; BORASCHI, D. From monocytes to M1/M2 macrophages: phenotypical vs. functional Differentiation. **Frontiers Immunology**, v.5, p. 514, Oct. 2014.

JAIN, S.; DARVEAU, R.P. Contribution of *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide to periodontitis. **Periodontology** 2000, v.54, n.1, p. 53-70, Oct. 2010.

JAKUBOVICS, N.S. *et al.* The dental plaque biofilm matrix. **Periodontology** 2000, v.86, n.1, p. 32-56, June 2021.

JAYAPRAKASH, K. *et al.* The role of phagocytosis, oxidative burst and neutrophil extracellular traps in the interaction between neutrophils and the periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*. **Molecular Oral Microbiology**, v.30, n.5, p. 361-375, Oct. 2015.

KANTARCI, A.; OYAIKU, K.; VAN DYKE, T.E. Neutrophil-mediated tissue injury in periodontal disease pathogenesis: findings from localized aggressive periodontitis. **Journal of Periodontology**, v.74, n.1, p. 66-75, Jan. 2003.

KANTRONG, N.; TO, T.T.; DARVEAU, R.P. Gingival epithelial cell recognition of lipopolysaccharide. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1197, p. 55-67, 2019.

KAPLAN, M.J.; RADIC, M. Neutrophil extracellular traps: double-edged swords of innate immunity. **Journal of Immunology**, v.189, n.6, p. 2689-2695, Sept. 2012.

KAYAL, R.A. The role of osteoimmunology in periodontal disease. **BioMed Research International**, v.2013, p. 639368, Sept. 2013.

KEYES, P.H.; JORDAN, H.V. Periodontal lesions in the syrian hamster. III. findings related to an infectious and transmissible component. **Archives of Oral Biology**, v.9, p. 377-400, July/Aug. 1964.

KIM, H.J. *et al.* *Porphyromonas gingivalis* accelerates atherosclerosis through oxidation of high-density lipoprotein. **Journal of Periodontal & Implant Science**, v.48, n.1, p. 60-68, Feb. 2018.

KIMMEL, D.B. Mechanism of action, pharmacokinetic and pharmacodynamic profile, and clinical applications of nitrogen-containing bisphosphonates. **Journal of Dental Research**, v.86, n.1, p. 1022-1033. 2007.

KINANE, D.F.; STATHOPOULOU, P.G.; PAPAPANOU, P.N. Periodontal diseases. **Nature Reviews Disease Primers**, v.3, p. 17038, June 2017.

KOCH, F.P. *et al.* The influence of bisphosphonates on human osteoblast migration and integrin α V β 3/tenascin C gene expression in vitro. **Head & Face Medicine**, v.7, n.4, p. 1-7, Feb. 2011.

KOVÁCS, I. *et al.* Comparison of proton channel, phagocyte oxidase, and respiratory burst levels between human eosinophil and neutrophil granulocytes. **Free Radical Research**, v.48, n.10, p. 1190-1199, Oct. 2014.

KUBISTA, B. *et al.* Anticancer effects of zoledronic acid against human osteosarcoma cells. **Journal of Orthopaedic Research**, v.24, n.6, p. 1145-1152, 2006.

LEONARD, E.J.; YOSHIMURA, T. Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). **Immunology Today**, v.11, n.1, p. 97-101, 1990.

LIN, J.H. Bisphosphonates: a review of their pharmacokinetic properties. **Bone**, v.18, n.2, p. 72-85, Feb. 1996.

LIN, M. *et al.* Different engagement of TLR2 and TLR4 in *Porphyromonas gingivalis* vs. ligature-induced periodontal bone loss. **Brazilian Oral Research**, v.31, p.e63, Aug. 2017.

LINDHE, J.; HAMP, S.E.; LÖE, H. Plaque induced periodontal disease in beagle dogs. A 4-year clinical, roentgenographical and histometrical study. **Journal of Periodontal Research**, v.10, n.5, p. 243-255, Nov. 1975.

LINDHE, J.; LANG, N.P. **Tratado de periodontia clínica e implantodontia oral**. 6. ed. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan, 2018.

LING, M.R.; CHAPPLE, I.L.; MATTHEWS, J.B. Peripheral blood neutrophil cytokine hyper-reactivity in chronic periodontitis. **Innate Immunity**, v.21, n.7, p. 714-725, Oct. 2015.

LIU, F.T. *et al.* Expression and function of galectin-3, a -galactoside-binding lectin, in human monocytes and macrophages. **The American Journal of Pathology**, v.147, n.4, p. 1016-1028, Oct. 1995.

LIU, Y.C. *et al.* Macrophage polarization in inflammatory diseases. **International Journal of Biological Sciences**, v.10, n.5, p. 520-529, May 2014.

LIU, Y.C.; LERNER, U.H.; TENG, Y.T. Cytokine responses against periodontal infection: protective and destructive roles. **Periodontology 2000**, v.52, n.1, p. 163-206, Feb. 2010.

LÖE, H. The gingival index, the plaque index and the retention index systems. **Journal of Periodontology**, v.38, n.6, p. 610-616, Dec. 1967.

LOE, H.; THEILADE, E.; JENSEN, S.B. Experimental gingivitis in man. **Journal of Periodontology**, v.36, n.3, p. 177-187, May 1965.

LOPEZ-OLIVO, M.A. *et al.* Bisphosphonates in the treatment of patients with lung cancer and metastatic bone disease: a systematic review and meta-analysis. **Supportive Care in Cancer**, v.20, n.11, p. 2985-2998, Nov. 2012.

LU, W. *et al.* Tolerance induced by *Porphyromonas gingivalis* may occur independently of TLR2 and TLR4. **PLoS One**, v.13, n.7, p. e0200946, July 2018.

LUND-JOHANSEN, F. *et al.* Activation of human monocytes and granulocytes by monoclonal antibodies to glycosylphosphatidylinositol-anchored antigens. **European Journal of Immunology**, v.23, n.11, p. 2782-2791, Nov. 1993.

MADRID, C.; SANZ, M. What impact do systemically administrated bisphosphonates have on oral implant therapy? A systematic review. **Clinical Oral Implants Research**, v.20, n.4, p. 87-95, Sept. 2009.

MAHALAKSHMI, K.; KRISHNAN, P.; CHANDRASEKARAN, S.C. Detection of *Tannerella forsythia* bspA and prfH genotypes among periodontitis patients and healthy subjects-A case-Control study. **Archives of Oral Biology**, v.96, n.1, p. 178-181, Dec. 2018.

MAHANONDA, R. *et al.* IL-8 andIDO expression by human gingival fibroblasts via TLRs. **Journal Immunology**, v.178, n.2, p. 1151-1157, Jan. 2007.

- MAKKONEN, N. *et al.* Contrasting effects of alendronate and clodronate on RAW 264 macrophages: the role of a bisphosphonate metabolite. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.8, n.2, p. 109-118, May 1999.
- MARTIN, P.; LEIBOVICH, S.J. Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly. **Trends in Cell Biology**, v.15, n.11, p. 599-607, Nov. 2005.
- MARTINEZ, F.O.; GORDON, S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. **F1000Prime Reports**, v.6, p. 13, Mar. 2014.
- MARX, R.E. *et al.* Bisphosphonate-induced exposed bone (osteonecrosis/ osteopetrosis) of the jaws: risk factors, recognition, prevention, and treatment. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v.63, n.11, p. 1567-1575, 2005.
- MATERA, G. *et al.* Receptor recognition of and immune intracellular pathways for *Veillonella parvula* lipopolysaccharide. **Clinical and Vaccine Immunology**, v.16, n.12, p. 1804-1809, 2009.
- MEDVEDEV, A.E. *et al.* Tolerance to microbial TLR ligands: molecular mechanisms and relevance to disease. **Journal of Endotoxin Research**, v.12, n.3, p. 133-150, 2006.
- MEDZHITOV, R.; PRESTON-HURLBURT, P.; JANEWAY JR, C.A. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. **Nature**, v.388, n.1, p. 394-397, July 1997.
- MILLS, C.D. Anatomy of a discovery: m1 and m2 macrophages. **Frontiers Immunology**, v.6, p. 212, 2015.
- MILLS, C.D. M1 and M2 macrophages: oracles of health and disease. **Critical Reviews in Immunology**, v.32, n.6, p. 463-488, 2012.
- MILLS, C.D. Macrophage arginine metabolism to ornithine/urea or nitric oxide/citrulline: a life or death issue. **Critical Reviews in Immunology**, v.21, n.5, p. 399-425, 2001.
- MIYAKE, K. Innate recognition of lipopolysaccharide by Toll-like receptor 4-MD-2. **Trends in Microbiology**, v.12, n.4, p. 186-192, 2004.
- MOREL, F.; DOUSSIERE, J.; VIGNAIS, P.V. The superoxide-generating oxidase of phagocytic cells: physiological, molecular and pathological aspects. **European Journal of Biochemistry**, v.201, n.3, p. 523-546, Nov. 1991.
- MURPHY, P.M. The molecular biology of leukocyte chemoattractant receptors. **Annual Review of Immunology**, v.12, n.1, p. 593-633, 1994.
- MUTHUKURU, M.; JOTWANI, R.; CUTLER, C.W. Oral mucosal endotoxin tolerance induction in chronic periodontitis. **Infection and Immunity**, v.73, n.2, p. 687-694, Feb. 2005.
- MYSAK, J. *et al.* *Porphyromonas gingivalis*: major periodontopathic pathogen overview. **Journal of Immunology Research**, v.2014, p. 476068, 2014.

NAGAI, Y. *et al.* Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution. **Nature Immunology**, v.3, n.7, p. 667-672, June 2002.

NAYAK, S.; GREENSPAN, S.L. Osteoporosis treatment efficacy for men: a systematic review and meta-analysis. **Journal of the American Geriatrics Society**, v.65, n.3, p. 490-495, Mar. 2017.

NEWMAN, M. *et al.* **Periodontia clínica**. 13. ed. Rio de Janeiro, RJ: GEN Guanabara Koogan, 2020.

NICOLATOU-GALITIS, O. *et al.* Medication-related osteonecrosis of the jaw: definition and best practice for prevention, diagnosis, and treatment. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology**, v.127, n.2, p. 117-135, Feb. 2019.

O'CARRIGAN, B. *et al.* Bisphosphonates and other bone agents for breast cancer. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v.10, n.10, p. CD003474, Oct. 2017.

OLCZAK, T. *et al.* Iron and heme utilization in *Porphyromonas gingivalis*. **FEMS Microbiology Reviews**, v.29, n.1 p. 119-144, Jan. 2005.

PAPAPANOU, P.N. *et al.* Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. **Journal of Periodontology**, v.89, n.1, p. 173-182, June 2018.

PAPAPOULOS, S.E.; CREMERS, S.C. Prolonged bisphosphonate release after treatment in children. **The New England Journal of Medicine**, v.356, n.10, p. 1075-1076, Mar. 2007.

PASSLICK, B.; FLIEGER, D.; ZIEGLER-HEITBROCK, H.W.L. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. **Blood**, v.74, n.7, 2527-2534, Nov. 1989.

PENNANEN, N. *et al.* Effect of liposomal and free bisphosphonates on the IL-1 beta, IL-6 and TNF alpha secretion from RAW 264 cells in vitro. **Pharmaceutical Research**, v.12, n.6, p. 916-922, June 1995.

POTEMPA, J.; PIKE, R.N. Corruption of innate immunity by bacterial proteases. **Journal of Innate Immunity**, v.1, n.2, p. 70-87, Jan. 2009.

PRADEEP, A.R. *et al.* 1% Alendronate gel as local drug delivery in the treatment of class JJ furcation defects: a randomized controlled clinical trial. **Journal of Periodontology**, v.84, n.3, p. 307-315, Mar. 2013.

PRADEEP, A.R. *et al.* Local drug delivery of alendronate gel for the treatment of patients with chronic periodontitis with diabetes mellitus: a double-masked controlled clinical trial. **Journal of Periodontology**, v.83, n.10, p. 1322-1328, Oct. 2012.

PRADEEP, A.R. Comparative evaluation of subgingivally delivered 1% alendronate versus 1.2% atorvastatin gel in treatment of chronic periodontitis: a randomized placebo-controlled clinical trial. **Journal of Investigative Clinical Dentistry**, v.8, n.3, Aug. 2017.

PRESHAW, P.M.; TAYLOR, J.J. How has research into cytokine interactions and their role in driving immune responses impacted our understanding of periodontitis? **Journal of Clinical Periodontology**, v.38, n.1, p. 60-84, Mar. 2011.

PRESHAW, P.M. Host modulation therapy with anti-inflammatory agents. **Periodontology** 2000, v.76, n.1, p. 131-149, Feb. 2018.

RICHARDSON, M.P. *et al.* A simple flow cytometry assay using dihydrorhodamine for the measurement of the neutrophil respiratory burst in whole blood: comparison with the quantitative nitrobluetetrazolium test. **Journal of Immunology Methods**, v.219, n.2, p. 187-193, Oct. 1998.

ROBERTS, F.A.; DARVEAU, R.P. Microbial protection and virulence in periodontal tissue as a function of polymicrobial communities: symbiosis and dysbiosis. **Periodontology** 2000, v.69, n.1, p. 18-27, Oct. 2015.

RODAN, G.A.; FLEISCH, H.A. Bisphosphonates: mechanisms of action. **The Journal of Clinical Investigation**, v.97, n.12, p. 2692-2696, June 1996.

ROELOFS, A.J. *et al.* Peripheral blood monocytes are responsible for $\gamma\delta$ T cell activation induced by zoledronic acid through accumulation of IPP/DMAPP. **British Journal of Hematology**, v.144, n.2, p. 245-250, Jan. 2009.

ROGERS, M.J. *et al.* Cellular and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. **Cancer**, v.88, n.15, p. 2961-2978, June 2000.

ROMAGNANI, S. Cytokines and chemoattractants in allergic inflammation. **Molecular Immunology**, v.38, n.12-13, p. 881-885, May 2002.

RÜCKERL, D.; ALLEN, J.E. Macrophage proliferation, provenance, and plasticity in macroparasite infection. **Immunology Reviews**, v.262, n.1, p. 113-133, Nov. 2014.

RUGGIERO, S.L. *et al.* Osteonecrosis of the jaws associated with the use of bisphosphonates a review of 63 cases. **Journal of Oral Maxillofacial Surgery**, v.62, n.5, p. 527-534, May 2004.

RUSSELL, R.G. Bisphosphonates: the first 40 years. **Bone**, v.49, n.1, p. 2-19, July 2011.

SAXE, S.R. *et al.* Oral debris, calculus, and periodontal disease in the beagle dog. **Periodontics**, v.5, n.5, p. 217-225, Sept. 1967.

SCHAEFER, T.M. *et al.* Toll-like receptor (TLR) expression and TLR-mediated cytokine/chemokine production by human uterine epithelial cells. **Immunology**, v.112, n.3, p. 428-436, July 2004.

SCHIERANO, G. *et al.* Cytokine production and bone remodeling in patients wearing overdentures on oral implants. **Journal of Dental Research**, v.79, n.9, p. 1675-1682, Sept. 2000.

SCHRÖDER, A.K. *et al.* Crosslinking of CD66b on peripheral blood neutrophils mediates the release of interleukin-8 from intracellular storage. **Human Immunology**, v.67, n.9, p. 676-682, Sept. 2006.

SCOTT, D.A.; KRAUSS, J. Neutrophils in periodontal inflammation. **Frontieres of Oral Biology**, v.15, p. 56-83, 2012.

SEDGHIZADEH, P.P. *et al.* Design, synthesis, and antimicrobial evaluation of a novel bone-targeting bisphosphonate- ciprofloxacin conjugate for the treatment of osteomyelitis biofilms. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.60, n.6, p. 2326-2343, Mar. 2017.

SEGUIER, S. *et al.* Is collagen breakdown during periodontitis linked to inflammatory cells and expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human gingival tissue? **Journal of Periodontology**, v.72, n.10, p. 1398-1406, Oct. 2001.

SERHAN, C.N. Resolution phase of inflammation: novel endogenous antiinflammatory and proresolving lipid mediators and pathways. **Annual Review Immunology**, v.25, n.1, p. 101-137, 2007.

SHAO, M.Y. *et al.* Interleukin-6 polymorphisms modify the risk of periodontitis: a systematic review and meta-analysis. **Journal of Zhejiang University**, v.10, n.12, p. 920-927, Nov. 2009.

SHAPIRA, L.; WARBINGTON, M.; VAN DYKE, T.E. TNF alpha and IL-1 beta in serum of LJP patients with normal and defective neutrophil chemotaxis. **Journal of Periodontal Research**, v.29, n.5, p. 371-373, Sept. 1994.

SHARMA, A. *et al.* Effect of periodontal therapy on salivary interleukin-12 levels in chronic periodontitis. **Journal of Clinical & Diagnostic Research**, v.8, n.10, p. 90-92, Oct 2014.

SHARMA, A.; PRADEEP, A.R. Clinical efficacy of 1% alendronate gel as a local drug delivery system in the treatment of chronic periodontitis: a randomized, controlled clinical trial. **Journal of Periodontology**, v.83, n.1, p. 11-18, Jan. 2012a.

SHARMA, A.; PRADEEP, A.R. Clinical efficacy of 1% alendronate gel in adjunct to mechanotherapy in the treatment of aggressive periodontitis: a randomized controlled clinical trial. **Journal of Periodontology**, v.83, n.1, p. 19-26, Jan. 2012b.

SHARMA, A.; RAMAN, A.; PRADEEP, A.R. Role of 1% alendronate gel as adjunct to mechanical therapy in the treatment of chronic periodontitis among smokers. **Journal of Applied Oral Science**, v.25, n.3, p. 243-249, 2017.

SHEETS, S.M. *et al.* Gingipain-dependent interactions with the host are important for survival of Porphyromonas gingivalis. **Frontiers in Bioscience**, v.13, n.1, p. 3215-3238, May 2008.

SHEOKAND, V.; CHADHA, V.S.; PALWANKAR, P. The comparative evaluation of 1% alendronate gel as local drug delivery system in chronic periodontitis in smokers and non smokers: Randomized clinical trial. **Journal of Oral Biology and Craniofacial Research**, v.9, n.2, p. 198-203, Apr. 2019.

SHIN, J.; JI, S.; CHOI, Y. Ability of oral bacteria to induce tissue-destructive molecules from human neutrophils. **Oral Diseases**, v.14, n.4, p. 327-334, May 2008.

SILVA, T.A. *et al.* Chemokines in oral inflammatory diseases: apical periodontitis and periodontal disease. **Journal of Dental Research**, v.86, n.4, p. 306-319, Apr. 2007.

SILVERMAN, S.L. *et al.* Effectiveness of bisphosphonates on nonvertebral and hip fractures in the first year of therapy: the risedronate and alendronate (REAL) cohort study. **Osteoporosis International**, v.18, n.1, p. 25-34, Jan. 2007.

SKUBITZ, K.M.; CAMPBELL, K.D.; SKUBITZ, A.P. CD66a, CD66b, CD66c, and CD66d each independently stimulate neutrophils. **Journal of Leukocyte Biology**, v.60, n.1, p. 106-117, July 1996.

SOCHALSKA, M.; POTEPA, J. Manipulation of Neutrophils by *Porphyromonas gingivalis* in the Development of Periodontitis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v.7, n.23, p. 197, May 2017.

SOILEAU, K.M. Oral post-surgical complications following the administration of bisphosphonates given for osteopenia related to malignancy. **Journal of Periodontology**, v.77, n.1, p. 738-743, 2006.

STOUT, R.D.; SUTTLES, J. Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments. **Journal of Leukocyte Biology**, v.76, n.3, p. 509-513, Sept. 2004.

SUGAWARA, S. *et al.* Contrasting effects of an aminobisphosphonate, a potent inhibitor of bone resorption, on lipopolysaccharide-induced production of interleukin-1 and tumour necrosis factor α in mice. **British Journal of Pharmacology**, v.125, n.1, p. 737-740, 1998.

SUN, Y. *et al.* Gram-negative periodontal bacteria induce the activation of Toll-like receptors 2 and 4, and cytokine production in human periodontal ligament cells. **Journal of Periodontology**, v.81, n.10, p. 1488-1496, Oct. 2010.

SUN, Y. *et al.* Effects of aging on endotoxin tolerance induced by lipopolysaccharides derived from *Porphyromonas gingivalis* and *Escherichia coli*. **PLoS One**, v.7, n.6, p. e39224, June 2012.

SUN, Y. *et al.* Endotoxin tolerance induced by lipopolysaccharides derived from *porphyromonas gingivalis* and *escherichia coli*: alternations in toll-like receptor 2 and 4 signaling pathway. **Inflammation**, v.37, n.1, p. 268-276, Feb. 2014.

TALAAT, R.M. *et al.* Effect of bisphosphonates treatment on cytokine imbalance between TH17 and Treg in osteoporosis. **Inflammopharmacology**, v.23, n.3, p. 119-125, June 2015.

TAMAI, R.; SUGIYAMA, A.; KIYOURA, Y. Alendronate regulates cytokine production induced by lipid A through nuclear factor- κ B and Smad3 activation in human gingival fibroblasts. **Journal of Periodontal Research**, v.46, n.1, p. 13-20, Feb. 2011.

TARDAST, A. *et al.* Bisphosphonate associated osteomyelitis of the jaw in patients with bony exposure: prevention, a new way of thinking. **Journal of Applied Oral Science**, v.23, n.3, p. 310-314, June 2015.

THOMAS, G. *et al.* Nonclassical patrolling monocyte function in the vasculature. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v.35, n.6, p. 1306-1316, June 2015.

THOMPSON, K. *et al.* Cytosolic entry of bisphosphonate drugs requires acidification of vesicles after fluid-phase endocytosis. **Molecular Pharmacology**, v.69, n.5, p. 1624-1632, May 2006.

TONETTI, M.S.; GREENWELL, H.; KORNMAN, K.S. Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. **Journal of Clinical Periodontology**, v.45, n.20, p. 149-161, June 2018.

TÖYRÄS, A. *et al.* Inhibition of mevalonate pathway is involved in alendronate induced cell growth inhibition, but not in cytokine secretion from macrophages in vitro. **European Journal Pharmaceutical Science**, v.19, n.4, p. 223-230, July 2003.

TURNER, M.D. *et al.* Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1843, n.11, p. 2563-2582, June 2014.

UEHARA, A.; TAKADA, H. Functional TLRs and NODs in human gingival fibroblasts. **Journal of Dentistry Research**, v.86, n.3, p. 249-254, Mar. 2007.

URBAN, C.F. *et al.* Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. **PLoS Pathogens**, v.5, n.10, p. e1000639, Oct. 2009.

VAN DYKE, T.E.; SERHAN, C.N. Resolution of inflammation: a new paradigm for the pathogenesis of periodontal diseases. **Journal of Dental Research**, v.82, n.2, p. 82-90, Feb. 2003.

VAN DYKE, T.E. Shifting the paradigm from inhibitors of inflammation to resolvers of inflammation in periodontitis. **Journal of Periodontology**, v.91, n.1, p.19-25, Oct. 2020.

VARANAT, M. *et al.* Activation of the TREM-1 pathway in human monocytes by periodontal pathogens and oral commensal bacteria. **Molecular Oral Microbiology**, v.32, n.4, p. 275-287, Aug. 2017.

VON KNOCH, F. *et al.* Effects of bisphosphonates on proliferation and osteoblast differentiation of human bone marrow stromal cells. **Biomaterials**, v.26, n.34, p. 6941-6949, Dec. 2005.

WALTER, C. *et al.* Influence of bisphosphonates on endothelial cells, fibroblasts, and osteogenic cells. **Clinical Oral Investigations**, v.14, n.1, p. 35-41, Feb. 2010.

- WANG, F. *et al.* Pro-Inflammatory Cytokine TNF- α Attenuates BMP9-Induced Osteo/Odontoblastic Differentiation of the Stem Cells of Dental Apical Papilla (SCAPs). **Cellular Physiology and Biochemistry**, v.41, n.4, p. 1725-1735, Mar. 2017.
- WANG, H. *et al.* Synthesis of a bone-targeted bortezomib with in vivo anti-myeloma effects in mice. **Pharmaceutics**, v.10, n.3, p. 1-13, Sept. 2018.
- WANG, H.L.; WEBER, D.; MCCAULEY, L.K. Effect of long-term oral bisphosphonates on implant wound healing: Literature review and a case report. **Journal of Periodontology**, v.78, n.1, p. 548-594, 2007.
- WANG, P.L. *et al.* Toll-like receptor 4-mediated signal pathway induced by *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide in human gingival fibroblasts. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.273, n.3, p. 1161-1167, July 2000.
- WATTS, N.B. Long-term risks of bisphosphonate therapy. **Archives of Endocrinology and Metabolism**, v.58, n.5, p. 523-529, July 2014.
- WEINREB, M. *et al.* Histomorphometrical analysis of the effects of the bisphosphonate alendronate on bone loss caused by experimental periodontitis in monkeys. **Journal of Periodontal Research**, v.29, n.1, p. 35-40, Jan. 1994.
- WHITAKER, M. *et al.* Bisphosphonates for osteoporosis- Where do we go from here? **The New England Journal of Medicine**, v.366, n.22, p. 2048-2051, May 2012.
- WILLIAMS, M.R. *et al.* Emerging mechanisms of neutrophil recruitment across endothelium **Trends in Immunology**, v.32, n.10, p. 461-469, Aug. 2011.
- XIONG, Y. *et al.* Endotoxin Tolerance Inhibits Lyn and c-Src Phosphorylation and Association with Toll-Like Receptor 4 but Increases Expression and Activity of Protein Phosphatases. **Journal of Innate Immunity**, v.8, n.2, p. 171-184, Oct. 2015.
- YAMAGUCHI, K. *et al.* Involvement of interleukin-1 in the inflammatory actions of aminobisphosphonates in mice. **British Journal of Pharmacology**, v.130, n.7, p. 1646-1654, 2000.
- YANG, J. *et al.* Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. **Biomarker Research**, v.2, p. 1, Jan. 2014.
- YANG, X. *et al.* Zoledronic acid regulates the synthesis and secretion of IL-1 β through Histone methylation in macrophages. **Cell Death Discovery**, v.6, p. 47, June 2020.
- YOON, J.; TERADA, A.; KITA, H. CD66b regulates adhesion and activation of human eosinophils. **Journal of Immunology**, v.179, n.12, p. 8454-8462, Dec. 2007.
- YU, X.; ANTONIADES, H.N.; GRAVES, D.T. Expression of monocyte chemoattractant protein 1 in human inflamed gingival tissues. **Infection and Immunity**, v.61, n.11, p. 4622-4628, Nov. 1993.

ZHANG, M. *et al.* IRAK-M modulates expression of IL-10 and cell surface markers CD80 and MHC II after bacterial re-stimulation of tolerized dendritic cells. **Immunology Letters**, v.144, n.2, p. 49-59, May 2012.

ZHANG, Y.; LI, X. Lipopolysaccharide-regulated production of bone sialoprotein and interleukin-8 in human periodontal ligament fibroblasts: the role of toll-like receptors 2 and 4 and the MAPK pathway. **Journal of Periodontal Research**, v.50, n.2, p. 141-151, Apr. 2015.

ZHOU, Q. *et al.* Cytokine profiling of macrophages exposed to *Porphyromonas gingivalis*, its lipopolysaccharide, or its Fim A protein. **Infection and Immunity**, v.73, n.2, p. 935-943, Feb. 2005.

ZHU, Y. *et al.* Porphyromonas gingivalis and Treponema denticola synergistic polymicrobial biofilm development. **PLoS One**, v.8, n.8, p. e71727, Aug. 2013.

ZIEGLER-HEITBROCK, L. *et al.* Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. **Blood**, v.116, n.16, p. 74-80, Oct. 2010.

ZIEGLER-HEITBROCK, L. The CD14+CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation. **Journal of Leukocyte Biology**, v.81, n.3, p. 584-592, 2007.

ANEXO A - Parecer Consubstanciado do CEP PUC Minas

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE
CATÓLICA DE MINAS GERAIS -
PUCMG

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Efeito de bisfosfonatos na atividade de leucócitos humanos estimulados por periodontopatógenos

Pesquisador: Paulo Eduardo Alencar de Souza

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 61550216.0.0000.5137

Instituição Proponente: Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais - PUCMG

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.866.655

Apresentação do Projeto:

Embora os principais alvos farmacológicos dos bisfosfonatos sejam os osteoclastos, com consequente inibição da reabsorção óssea, outras células podem ser afetadas por essas drogas. A utilização de bisfosfonatos pode afetar as respostas biológicas nos tecidos periodontais e periimplantares relacionadas à doença periodontal e periimplantite. Serão coletados 20 mL de sangue de 20 doadores saudáveis (realizada por uma enfermeira). Os leucócitos serão incubados com bisfosfonatos nitrogenados e bisfosfonatos não nitrogenados em diferentes concentrações para se determinar a curva de citotoxicidade.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar o efeito de diferentes tipos de bisfosfonatos na expressão de citocinas e moléculas de superfície por leucócitos humanos estimuladas ou não por periodontopatógenos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: É possível que durante a coleta de sangue o indivíduo sinta pequeno desconforto. Posteriormente, é possível que ocorra um hematoma na área, o que é minimizado por meio de compressão com dedo no local.

Benefícios: Não haverá benefícios diretos aos indivíduos participantes. Os resultados obtidos e

Endereço: Av. Dom José Gaspar, 500 - Prédio 03, sala 228

Bairro: Coração Eucarístico

CEP: 30.535-901

UF: MG

Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3319-4517

Fax: (31)3319-4517

E-mail: cep.propg@pucminas.br

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE
CATÓLICA DE MINAS GERAIS -
PUCMG**



Continuação do Parecer: 1.866.655

analisados em conjunto poderão contribuir para conhecimento sobre os efeitos dos bisfosfonatos nos processos imunoinflamatórios relacionados à doença periodontal e periimplantite.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Relevante.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos de apresentação obrigatória foram anexados e estão de acordo com as normas vigentes.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_818066.pdf	01/11/2016 10:11:09		Aceito
Folha de Rosto	folha_rostoassinada.pdf	01/11/2016 10:09:37	Paulo Eduardo Alencar de Souza	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_bisfosfonatos.doc	30/10/2016 01:16:43	Paulo Eduardo Alencar de Souza	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_bisfosfonatos_CEP.doc	30/10/2016 01:11:34	Paulo Eduardo Alencar de Souza	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BELO HORIZONTE, 14 de Dezembro de 2016

**Assinado por:
CRISTIANA LEITE CARVALHO
(Coordenador)**

Endereço: Av. Dom José Gaspar, 500 - Prédio 03, sala 228
Bairro: Coração Eucarístico **CEP:** 30.535-901
UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3319-4517 **Fax:** (31)3319-4517 **E-mail:** cep.proppg@pucminas.br

ANEXO B - Produção intelectual do aluno durante o Curso de Doutorado

✓ PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

○ Artigo completo publicado em periódico



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Archives of Oral Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/archoralbio



Resinous adhesive systems differentially affect the expression of cytokines by human monocytes stimulated or not with *Streptococcus mutans* in vitro

Marco Antônio Xambre de Oliveira Santos^a, Hércules Henrique Onibene Castro^a,
 Luísa Mourão Dias Magalhães^b, Walderez Ornelas Dutra^{b,c}, Kenneth John Gollob^{c,d},
 Natália Rocha Guimarães^e, Paula Prazeres Magalhães^e, Luiz de Macêdo Farias^e,
 Martinho Campolina Rebello Horta^a, Paulo Eduardo Alencar Souza^{a,*}

^a Graduate Program in Dentistry, Department of Dentistry, Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Av. Dom José Gaspar, 500, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil
^b Department of Morphology, ICB, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil
^c Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Doenças Tropicais – INCT-DT, Av. Antônio Carlos, 6627, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil
^d International Research Center, A.C. Cansargo Cancer Center, Rua Tupac, 440, São Paulo, São Paulo, Brazil
^e Department of Microbiology, ICB, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil



ARTICLE INFO

Keywords:
 Cytotoxicity
 Dental adhesive
 Monocyte
 Cytokine
Streptococcus mutans

ABSTRACT

Objectives: The polymerization of adhesive systems is incomplete and the residual monomers that have been released have a cytotoxic capacity. Some teeth develop into pulp necrosis after composite resin restorations. Considering frequent pulpal inflammation in response to cariogenic bacteria, substances released from the patches could affect the cells of the inflammatory infiltrate and interfere with the mechanisms of defense against microorganisms and protection of pulpal tissue. The aim of this study was to evaluate the effect of substances released by different resinous adhesive systems on cell viability and cytokine expression by human monocytes stimulated in vitro with *Streptococcus mutans*.

Design: Peripheral blood mononuclear cells from 10 healthy subjects were stimulated with *S. mutans* and then incubated with supernatants obtained from the Single Bond Universal (SBU) or Clearfil SE Bond (CSEB) adhesive systems for eight hours. Staining with Annexin V and 7AAD for analysis of apoptosis were performed and detection of monocytes expressing cytokines IL-1α, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 and TNF-α were performed by flow cytometry.

Results: No treatment significantly affected apoptosis in monocytes. SBU supernatant increased the frequency of monocytes expressing IL-8 and decreased the monocytes expressing IL-10. Considering *S. mutans*-stimulated cells, while SBU increased the frequency of IL-8⁺ monocytes, CSEB reduced the frequency of IL-6 and TNF-α positive monocytes.

Conclusions: Products released from SBU seem to induce proinflammatory effects on monocytes while those from CSEB show an anti-inflammatory outcome. These effects may interfere in the control of cytokine-mediated immunoinflammatory pulp reactions, both in the presence and absence of stimulation by cariogenic bacteria.

1. Introduction

In order to perform composite resin restorations, it is necessary to use a bonding agent: the adhesives. With advances in technology, adhesive systems have gained the possibility of being used in new formulations and conditions such as all-in-one systems (Inoue et al., 2001; Perdigão, 2007; Pashley et al., 2011). Adhesive systems are composed

of a small amount of inorganic filler and organic matrix, which generally contains methacrylate monomers (Perdigão, 2007; Pashley et al., 2011). In addition to the monomers, other substances, such as activators, photoinitiators, polymerization inhibitors and solvents (Van Landuyt et al., 2011), are also released even after photopolymerization, with potential for cytotoxicity (Aranha, Giro, Hebling, Lessa, & Costa, 2010). These components are able to diffuse through the dentinal

* Corresponding author at: Departamento de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Avenida Dom José Gaspar, 500, Prédio 46, Sala 101, Coração Eucarístico, Belo Horizonte, Minas Gerais, CEP: 30535-901, Brazil.
 E-mail address: pauloalencar@pucminas.br (P.E.A. Souza).

○ Trabalho publicado em anais de evento

PN1291

Efeito de bisfosfonatos na produção de citocinas por monócitos humanos estimulados com *Porphyromonas Gingivalis*

Castro HHO*, Silva EC, Koh CC, Souza ICE, Silva BJA, Dutra WO, Horta MCR, Souza PEA
PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE MINAS GERAIS.

E-mail: herculesonibene@hotmail.com

Os bisfosfonatos acumulam-se nos ossos maxilares e atuam principalmente nos osteoclastos, embora possam ser endocitados por células monocíticas/macrológicas e alterar a produção de algumas citocinas. O objetivo do estudo foi avaliar o efeito do alendronato de sódio (Ale) e do ácido zoledrônico (Zo), em concentrações plasmáticas, na expressão de citocinas pró e anti-inflamatórias por células mononucleares de sangue periférico humano (CMSP), estimuladas com *Porphyromonas gingivalis*. CMSP de 10 doadores saudáveis foram incubadas com os bisfosfonatos, na ausência ou presença de *P. gingivalis*, e avaliadas quanto à viabilidade celular e produção das citocinas IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 e TNF por monócitos CD14+, utilizando-se citometria de fluxo. A adição de Ale ou Zo em concentrações variando de 10 a 320 ng/ml, não alteraram significativamente a morte das CMSP. A adição dos bisfosfonatos na concentração de 40 ng/ml, também não afetou a produção das citocinas avaliadas. Embora a estimulação com *P. gingivalis* tenha aumentado as frequências de monócitos produtores de todas as citocinas avaliadas, a exposição prévia dessas células a Ale ou Zo não afetou a produção das citocinas.

*Alendronato de sódio e ácido zoledrônico, em concentrações similares às encontradas no plasma de pacientes, podem não interferir na resposta imunoinflamatória pela produção de citocinas em sites periodontais ou perimplantares infectados com *P. gingivalis*.*

Apoio: FAPEMIG - APQ03601-16

✓ **EVENTOS**

- **Participação em eventos, congressos**



✓ PRODUÇÃO TÉCNICA

○ Desenvolvimentos de material didático ou instrucional

1. **CASTRO, HÉRCULES HENRIQUE ONIBENE**; Gomes, H. E.; CUNHA, R. A. A; LANZA, G. L; HORTA, M. C. R.; SOUZA, P. E. A. Aplicações Clínicas dos Mini-implantes na ortodontia. 2019. (Desenvolvimento de material didático ou instrucional - vídeo).

2. PENIDO, F. O.; **CASTRO, HÉRCULES HENRIQUE ONIBENE**; SERAIDARIAN, K. K. A.; ALMEIDA, L. F.; CARDOSO, P. A.; CUNHA, R. A. A.; SERAIDARIAN, P. I. Higienização das dentaduras: um cuidado para sua saúde. 2019. (Desenvolvimento de material didático ou instrucional - Vídeo).

3. **CASTRO, HÉRCULES HENRIQUE ONIBENE**; Gomes, H. E; CUNHA, R. A. A; LANZA, G. L; HORTA, M. C. R.; SOUZA, P. E. A. Preservação alveolar com biomateriais. 2019. (Desenvolvimento de material didático ou instrucional - vídeo).

4. ALVES, R; LANZA, G.; Gomes, H. E.; **ONIBENE CASTRO, HÉRCULES HENRIQUE**; VESPASIANO, A.; MANZI, F. R. Efeitos dos Raios X e biossegurança na radiologia odontológica. 2018. (Desenvolvimento de material didático ou instrucional - Vídeo Gotas de Conhecimento).